Synthese von Peptiden zur immunologischen Bestimmung von Proteinen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Christner
aus Bad Urach

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0024

SYNTHESE VON PEPTIDEN ZUR IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON PROTEINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jürgen Christner
aus Bad Urach

1984

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Günther Jung

in der Zeit von März 1982 bis April 1984 im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an der Arbeit und für viele wertvolle Anregungen.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1984

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

Abstract

Christner, Jürgen:

SYNTHESE VON PEPTIDEN ZUR IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG VON PROTEINEN

Zur immunologischen Bestimmung von tryptisch gespaltenem α- und γ-Interferon wurden Penta- und Heptapeptide synthetisiert, welche bei der tryptischen Interferonspaltung zu erwarten sind. Durch N- und C-terminale Kupplung eines Pentapeptids vom α-IFN an Proteine wurden aus Kaninchen unterschiedlich spezifische Antiseren gewonnen. Die Immunreaktivität wurde in einem ELISA-Test untersucht.

Mit Hilfe eines synthetischen Tetrapeptids und eines monoclonalen Antikörpers wurde ein Epitop auf der Oberfläche des TMV-Hüllproteins bestimmt. Hierzu wurde das Tetrapeptid mit einem neu entwickelten Hydrazido-succinyl-Crosslinker spezifisch N-terminal in definierten Beladungen an Polylysin und Humanalbumin gekuppelt. Es wurde vollständige Beladung der Polylysin-Matrix mit Tetrapeptid erhalten. Die Peptid-Polymer-Konjugate wurden auf ihre Konformation und Immunreaktivität in Abhängigkeit von der Peptidbeladung untersucht.

Aus einem bestimmten Stück der mitochondrialen DNA (URF-1) des Pilzes N. crassa, welches große Homologie zu einer entsprechenden menschlichen DNA-Sequenz aufweist, wurde ein Nona- und Tetradecapeptid synthetisiert. Die Auswahl der Peptidsequenzen wurde mit einer computerunterstützten Analyse der Sekundärstruktur und Hydrophilie des Proteins getroffen. Mit den in Kaninchen erzeugten Antikörpern gegen die spezifisch an Proteine gebundenen Peptide konnte ein neues mitochondriales Protein identifiziert werden.

A.	EINLEITUNG	1
1.	Antikörper gegen synthetische Peptide	2
2.	Die Natur der antigenen Determinanten und die Immunantwort	5
3.	Auswahl antigener Proteinsequenzen für die Synthese von Peptiden	8
3.1.	Strukturaussagen mittels CD-Messungen	10
4.	Ankupplung der Peptide an Carrier	11
5.	Auswahl des Carrier	15
6.	Adjuvantien	15
7.	Assays für Antikörper	16
8.	Problem der Kreuzreaktivität	18
9.	Proteinreinigung	19
10.	Peptidsynthesen	20
11.	Problemstellung	22
B.	IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VERSCHIEDENER INTERFERONTYPEN	24
1.	Auswahl der Interferonsequenzen	26
1.1.	α-IFN-5 (146-150): Ala-Glu-Ile-Met-Arg	26
1.2.	γ-IFN-5 (84-88): Phe-Phe-Asn-Ser-Asn	26
1.3.	γ-IFN-7 (52-58): Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys	27
2.	Synthesen der Interferonpeptide	27
2.1.	Ala-Glu-Ile-Met-Arg (α-IFN-5)	27
2.2.	Phe-Phe-Asn-Ser-Asn (γ-IFN-5)	28
2.3.	Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys (γ-IFN-7)	29
2.4.	Racemisierungstests der Interferonpeptide	31
3.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	32
3.1.	^{13}C-NMR-Spektrum von α-IFN-5	32
3.2.	^{13}C-NMR-Spektrum von γ-IFN-5	32
3.3.	^{13}C-NMR-Spektrum von H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu	35
3.4.	Massenspektrometrie von γ-IFN-5 und γ-IFN-7	35

4.	Kupplung der Interferonpeptide an Proteine	45
4.1.	Protein-(α-IFN-5)-Konjugat	45
4.2.	Protein-(γ-IFN-5)-Konjugat	45
4.3.	Protein-(γ-IFN-7)-Konjugat	46
5.	Immunologische Ergebnisse	46
C.	SYNTHESE EINES TETRAPEPTIDS ZUR BESTIMMUNG EINES EPITOPS AUF DEM TMV-HÜLLPROTEIN MIT HILFE EINES MONOCLONALEN ANTIKÖRPERS	49
1.	Synthese des Tetrapeptids und der Konjugate	49
1.1.	Racemisierungstest von HSc-TMV-4	52
2.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	55
2.1.	Tetrapeptid und Crosslinker-Tetrapeptid	55
2.2.	Tetrapeptid-Polylysin-Konjugate	55
3.	Circulardichroismus	63
3.1.	Konformationsanalyse der TMV-Hüllproteine	66a
4.	Immunreaktivität des synthetischen Tetrapeptids TMV-4 mit poly- und monoclonalen Antikörpern	71
D.	IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN MITOCHONDRIALEN PROTEINS AUS DER URF-1-DNA-SEQUENZ VON NEUROSPORA CRASSA MITTELS PEPTIDANTIKÖRPERN	78
1.	Einleitung	78
2.	Auswahl der Peptidsequenzen	81
3.	Synthese der Peptide und Konjugate	85
3.1.	Synthese von NC-9 und BSA-NC-9-Konjugaten	85
3.2.	Synthese von NC-14 und des HSA-NC-14-Konjugats	86
4.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	87
4.1.	^{13}C-NMR-Spektrum von Fmoc-NC-9	87
4.2.	^{13}C-NMR-Spektrum von NC-14	92
5.	CD-Spektren	96
5.1.	CD-Spektrum von NC-9	96
5.2.	CD-Spektrum von NC-14	

6.	Massenspektrometrie von NC-9 und NC-14	99
7.	Immunologische Ergebnisse	100
7.1.	Immundekorierung	100
7.2.	Nachweis des Proteins mit radioaktiv markiertem Antigen	104
E.	ENTWICKLUNG UND SYNTHESE EINES NEUEN VERBRÜCKUNGSREAGENS (CROSSLINKER)	107
1.	Synthese der Crosslinker-Verbindungen	108
1.1.	Synthese der Hydrazidosuccinyl(HSc-)-Crosslinker	108
1.2.	Synthese der Hydrazidosuccinyl(HSc-)-Aminosäure-Crosslinker	111
2.	Kupplung der Crosslinker-Derivate	112
3.	^{13}C-NMR-Spektroskopie der Crosslinker-Derivate	113
4.	Weitere Anwendungen der HSc-Crosslinker-Verbindungen	113
F.	EXPERIMENTELLER TEIL	117
1.	Chemikalien und Methoden	117
2.	Peptidsynthesen nach der Festphasenmethode	121
2.1.	Kupplung der ersten N_α-Fmoc-Aminosäure an das p-Alkoxybenzylalkohol-Trägerharz	121
2.2.	Symmetrische Fmoc-Aminosäureanhydride (allg. Vorschrift)	122
2.3.	Kupplung von Asn und Glu	122
2.4.	Abspaltung des N_α-Fmoc-geschützten bzw. freien Peptids vom Polymer	122
2.5.	H-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-OH x 2 HCl (α-IFN-5)	124
2.6.	H-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-OH x HCl (γ-IFN-5)	127
2.7.	H-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu-Tyr-Val-OH x 3 HCl (NC-9)	130

2.8.	H-Ala-Glu-Thr-Asn-Arg-Ala-Pro-Phe-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Glu-OH x 2 HCl (NC-14 x 2 HCl)	135
3.	Peptidsynthesen nach der klassischen Methode	138
3.1.	Synthese von H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-OH x 2 HCl (γ-IFN-7)	139
3.2.	Synthese der C-terminalen Sequenz H-Gly-Pro-Ala-Thr-OH (155-158) des Hüllproteins von TMV vulgare	147
4.	Darstellung der Polymer-Peptidkonjugate	152
4.1.	Allgemeine Vorschrift	152
4.2.	Kupplung von α-IFN-5 an HSA mittels Xylylendiisocyanat (XDC)	153
4.3.	Entacylierung des N_{α}-Fmoc-NC-9-BSA-Konjugats	153
4.4.	Kupplung von Hydrazidosuccinyl-(HSc)-Verbindungen an Polymere, z.B. a) Proteine, b) Polyaminosäuren, c) unlösliche Polymere (z.B. Aminosepharose)	153
4.5.	Beispiele für Kupplungen von ungeschützten HSc-Peptiden	155
5.	Synthese der Hydrazido-succinyl(HSc)-Crosslinker-Verbindungen und verwandter Derivate	158
5.1.	Typische Anwendungsbeispiele der geschützten HSc-Derivate	165
6.	MICRO-ELISA-Immunoassay mit Antiseren gegen Pentapeptid α-IFN-5	170
6.1.	Titerbestimmung der α-IFN-5-Antiseren mit MICRO-ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent-Assay)	171
6.2.	Inhibitionsassay an α-IFN-5-Antiseren	174
6.3.	Bindungsversuche von α-IFN-5-POD an gereinigtes beschichtetes Antiserum (competitiver ELISA)	175
6.4.	Verwendete ELISA-Puffer	177
G.	ZUSAMMENFASSUNG	178
H.	LITERATURVERZEICHNIS	180

ABKÜRZUNGEN

Methoden

ASA	Aminosäurenanalyse
CD	Circulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FD-MS	Felddesorptions-Massenspektrometrie
FAB-MS	Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Chemikalien

AcOH	Eisessig
BSA	Rinderserumalbumin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Essigester
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid
HSA	Humanserumalbumin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
IFN	Interferon
KLH	Key Hole Limpet Hemocyanin
MeOH	Methanol
NMM	N-Methylmorpholin
PE	Petrolether
POD	Meerrettich-Peroxidase
R	Trägerharz, PS-DVB = Poly(Styrol-Divinylbenzol)-Copolymer
THF	Tetrahydrofuran
TFE	Trifluoressigsäure

TDM	4,4'-Bis-(dimethylamino)diphenylmethan
XDC	Xylylendiisocyanat

Schutzgruppen und Reste

Boc	tert.-Butyloxycarbonyl-
tBu	tert.-Butyl-
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Z	Benzyloxycarbonyl-
Sc	Succinyl Rest: $-CO-CH_2-CH_2-CO$ oder $HOOC-CH_2-CH_2-CO$
HSc	Hydrazidosuccinyl: $-NH-NH-CO-CH_2-CH_2-CO-$ bzw. $NH_2-NH-CO-CH_2-CH_2-CO$

Peptide

α-IFN-5	Ala-Glu-Ile-Met-Arg: α-IFN (146-150)
γ-IFN-5	Phe-Phe-Asn-Ser-Asn: γ-IFN (84-88)
γ-IFN-7	Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys: γ-IFN (52-58)
NC-9	Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu-Tyr-Val- Sequenz 60-69 eines neuen mitochondrialen Proteins des Pilzes Neurospora crassa (NC)
NC-14	Ala-Glu-Thr-Asn-Arg-Ala-Pro-Phe-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Glu-Sequenz 200-214 des neuen Proteins von N. crassa
TMV-4	Gly-Pro-Ala-Thr: C-terminale Sequenz 155-158 des Hüllproteins vom Tabak-Mosaik-Virus (TMV)
$Poly(L-Lys)_n$	Polylysin mit n Lysinmonomeren

Aminosäuren, Peptide und ihre Derivate wurden nach IUPAC-IUB-Empfehlungen abgekürzt [Eur. J. Biochem. 27, 201-207 (1972) und 74, 1-6 (1977)].

A. EINLEITUNG

Mit der Einführung und Beschreibung der ersten immunologischen Analysenmethode 1958 zur Bestimmung von Insulin [1] im Blutplasma wurde eine stürmische Entwicklung immunologischer Nachweisverfahren eingeleitet. Die Möglichkeit, Picogramm-Mengen eines Wirkstoffs neben millionenfachem Überschuß an störenden Substanzen nachweisen zu können, war faszinierend. Keine andere instrumentelle Methode vermochte Ähnliches zu leisten. Für die Analytik von Natur- und Wirkstoffen schien sich die bereits von Galileo Galilei aufgestellte Forderung zu erfüllen:

> Messen was meßbar ist
> und meßbar machen
> was noch nicht gemessen werden kann.

Wie kann man Wirkstoffe in so geringen Mengen erfassen?

Grundlage für alle Immunoassays sind die Antikörper, welche gebildet werden, wenn der zu bestimmende Wirkstoff (Protein, Peptidhormon, Steroid, etc.), auch Antigen oder Immunogen genannt, einem fremden Organismus injiziert wird. Der lebende Organismus bildet nach einiger Zeit Antikörper (Immunglobuline verschiedener Klassen) gegen das als fremd erkannte Antigen. Bedingung für die Antikörperbildung (Immunantwort) ist, daß das Antigen hochmolekular ist. Niedermolekulare Stoffe (z.B. Peptide, Steroide), Haptene genannt, erzeugen als solche keine Antikörper und müssen deshalb an makromolekulare Träger (Carrier) kovalent gebunden werden. Gute Immunogene sind z.B. Proteine, Polysaccharide und Copolymere von Aminosäuren. Antikörper erkennen in der Antigen-Antikörper Reaktion das entsprechende Antigen:

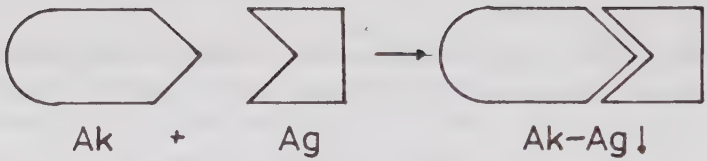


Abb. A.1: Antikörper (AK) + Antigen (Ag) ⟶ Ak-Ag-Komplex↓

Antigen-Antikörper-Komplexe fallen meist als Immunpräzipität aus. Antiseren, welche bei der Immunisierung mit Proteinen bzw. Protein-Peptidkonjugaten erhalten werden, bestehen nicht aus einer einheitlichen Sorte von Antikörpermolekülen (Immunglobuline). Sie enthalten eine Vielzahl von Antikörpern, welche gegen verschiedene Strukturelemente des Proteins bzw. des gekuppelten Peptids gerichtet sind (polyclonale Antikörper). Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. in einem Immunoassay wird mit einem definierten Antigen der entsprechende spezifische Antikörper erkannt, geht man einmal davon aus, daß keine Kreuzreaktionen stattfinden (vgl. Kap.A.8).
Erst in den letzten Jahren ist es gelungen mittels der Hybridoma-Technik nur eine bestimmte Sorte Antikörper zu erzeugen (monoclonale Antikörper) [125], welche gegen ein definiertes Strukturelement gerichtet sind.

1. Antikörper gegen synthetische Peptide

Die ersten Immunoassays, vor allem Radioimmunoassays (RIA) wurden für natürliche Proteine, Peptidhormone und Steroide aufgestellt [1a,3]. Mit der Entwicklung neuer Strategien

und Taktiken zur Peptidsynthese Anfang der 60er Jahre konnten nicht nur biologisch aktive Peptide synthetisiert werden, sondern auch definierte Fragmente von Proteinen. Da synthetische Proteinfragmente, z.B. Hepta- bis Tetradecapeptide, antigene Bereiche (Determinanten) eines Proteins widerspiegeln [2], konnten Antikörper gegen diese Peptide gewonnen werden [3]. Mit Hilfe der Peptidantikörper, in Kombination mit Immunoassaymethoden, war eine neue Möglichkeit zum Nachweis von Proteinen geschaffen.

Grundlegend für eine solche Methodenentwicklung waren die Arbeiten von Anderer et al. [4] am Tabak-Mosaik-Virus-(TMV)-Hüllprotein. Er konnte in Kaninchen Antikörper gegen ein Hexapeptid erzeugen, das er nach enzymatischer Spaltung der Virus-Proteinhülle (2200 identische Proteineinheiten) erhalten hatte. Das erhaltene Antipeptidserum reagierte mit dem Hüllprotein und konnte, im Überschuß mit TMV-Viren gemischt, die Infektiosität der Viren auf Tabakblättern hemmen. Das Hexapeptid konnte dem C-terminalen Teil der Proteineinheiten zugeordnet werden und ist morphologisch so exponiert, daß es eine immunologisch aktive (antigene) Region der Proteinoberfläche von TMV darstellt.

Erste Voraussetzung, um Proteine mittels Antikörper gegen rein synthetische Proteinfragmente (Peptide) zu bestimmen, ist die Kenntnis der Primärsequenz des Proteins. Diese ist zum einen über die klassischen Proteinsequenzierungstechniken [6], zum anderen über die Sequenzierung der entsprechenden DNA bzw. RNA [6a] zugänglich. Oft ist die DNA bzw. RNA-Sequenzierung schneller und einfacher, so daß es vorkommt, daß die Primärsequenz eines Proteins bekannt ist, ohne daß dieses vorher isoliert wurde.

Bei Kenntnis der Primärsequenz sowie der Auswahlkriterien [5] für antigene Determinanten eines Proteins, lassen sich bereits Peptide von bekannten und neuen "hypothetischen"

Proteinen synthetisieren. Die von solchen Peptiden induzierten Antikörper dienen als 'Sonde' bei der Suche nach neuen Proteinen. Auf diese Weise können neue Proteine und Enzyme identifiziert und affinitätschromatographisch an Sepharose-Peptidantikörper -Gelen isoliert werden. Ihre Wirkungsweise, Wirkort und Funktion in Zellen, Zellmembranen, Zelloberflächen oder im Plasma kann aufgeklärt werden [7,8]. So war es möglich Proteine von einigen Oncogenen (tumorinduzierende Gene gewisser Viren) zu identifizieren, diese an bestimmten Stellen der Oberfläche von Tumorzellen aufzuspüren [9-11] und sie in ihrer Wirkung durch entsprechende Antikörper zu neutralisieren.
Da viele der noch gesuchten Proteine in äußerst geringen Mengen vorkommen, meist unter 0.1-1 % der Gesamtproteinmenge in Zellen, ist die Methode der Antikörper gegen synthetische neue Proteinfragmente die Methode der Wahl.

Einer der interessantesten Aspekte für die Zukunft ist die Möglichkeit neue synthetische Impfstoffe gegen viruelle und bakterielle Infektionen zu entwickeln [14-17]. Aufbauend auf den Arbeiten von Anderer et al. [12,13] am TMV-Hüllprotein, entwickelten zahlreiche Wissenschaftler in den letzten Jahren Peptidantiseren, mit welchen die Infektiosität einiger Viren in Tierversuchen gehemmt bzw. neutralisiert werden konnte. Langbeheim [18] synthetisierte 1976 ein Peptid (21 Aminosäuren) des Hüllproteins vom Bacteriophagen MS-2, koppelte es an das synthetische Copolymer poly(D,L-Ala)----poly(L-Lys) [19] und erhielt nach Immunisierung von Kaninchen ein Antiserum, welches die Infektiosität des Virus vollständig neutralisierte.

Wachsende Kenntnisse über Sekundärstrukturanalyse, Voraussagemöglichkeiten der antigenen Oberflächendeterminanten und über die serologischen Eigenschaften von Proteinen bzw. Virushüllproteinen führten zur Entwicklung von Antipeptid-

seren gegen den Maul- und Klauenseuche-Virus [20,21], verschiedene Typen von Influenza-Virus [22,24] und den Hepatitis-B-Virus [25-29]. Daß synthetische Impfstoffe keine Zukunftsvision sind, zeigen aktive und passive Immunisierungserfolge gegen Maul- und Klauenseuche-Virus an Meerschweinchen.

Der bisher größte Erfolg ist ein vollsynthetischer Impfstoff gegen Diphterie, mit Hilfe dessen Meerschweinchen vollständig immunisiert werden konnten [30]. Tetradeca-, Hexadeca- und Octadecapeptide wurden zusammen mit dem synthetischen Adjuvans Muramyldipeptid (MDP) an den synthetischen Carrier poly(D,L-Ala)----poly(L-Lys) kovalent gekuppelt. Die erhaltenen wasserlöslichen Konjugate wurden immunisiert. In diesen Versuchen konnte das Muramyldipeptid [31,32] das (nur bei Tieren einsetzbare) Freundsche Adjuvans [33] ersetzen und das Copolymer poly(D,L-Ala)----poly(L-Lys) wurde statt den üblichen natürlichen Carrierproteine eingesetzt.

Um die Methode der Peptidantikörper zum Nachweis von neuen Proteinen heranzuziehen, deren Sequenz nur über DNA oder RNA bekannt ist, sind z.B. neben der Primärsequenz, noch Kenntnisse erforderlich über die Antigenität von Peptiden und Proteinen, über Sekundärstrukturanalyse von Proteinen, geeignete Hapten-Carrier und Kupplungs- bzw. Crosslinking-Methoden und letztendlich über die verschiedenen Immunoassays.

2. Die Natur der antigenen Determinanten und die Immunantwort

Um Proteinfragmente (Peptide) mit antigenen Eigenschaften zu synthetisieren, ist es wichtig möglichst viel über

Eigenschaften und Vorkommen antigener Determinanten zu kennen. Eine sehr ausführliche und komplette Analyse der antigenen Oberflächendeterminanten, welche am Waal-Myoglobin [34,35] und am Lysozym [36,37] durchgeführt wurden, ergaben wesentliche neue Erkenntnisse über die Eigenschaften antigener Bereiche. Von beiden Proteinen ist die Sequenz und die räumliche Struktur seit Jahren bekannt. Waal-Myoglobin enthält auf seiner Proteinoberfläche 5 antigene Determinanten von ca. 5-7 vorwiegend polaren Aminosäuren in jeweils zusammenhängender Reihenfolge (kontinuierliche Determinanten). Alle Determinanten liegen auf der Außenseite des Moleküls und gewöhnlich, aber nicht immer, an "β-Bends" (Turns oder Biegungen) zwischen α-helikalen Segmenten.

Im Gegensatz dazu, finden sich im Lysozym antigene Determinanten, welche sich aus verschiedenen Teilen der Polypeptidkette zusammensetzen (diskontinuierliche Determinanten) [38-40]. Offenbar sind alle natürlichen Determinanten in Myoglobin und Lysozym mehr oder weniger stark konformationsabhängig: Gegen synthetisiertes "loop"-Peptid (Sequenz Nr. 60-83) von Lysozym, welches zwischen Position 64 und 80 eine Disulfidbrücke besitzt, wurden Antikörper gebildet, welche sowohl mit dem synthetisierten Peptid, als auch mit dem nativen Lysozym reagierten. Wird die Disulfidbrücke gespalten, reagiert das offenkettige Peptid nicht mehr mit den Antikörpern.

20 Peptide, welche 75 % der Hemagglutinin-Sequenz abdecken [41,42], wurden synthetisiert, 18 davon bildeten Antikörper, welche mit dem nativen Protein reagierten, jedoch keinen antigenen Regionen des Moleküls zugeordnet werden konnten [43]. Keines der 20 Peptide reagierte mit Antikörpern, welche vom natürlichen Protein gebildet wurden. Dieses wichtige Ergebnis besagt, daß synthetische

Peptide während der normalen Immunantwort andere Antikörper erzeugen als das native Protein. Deswegen sollte auch unterschieden werden zwischen immunogenen und antigenen Bereichen eines Proteins. Immunogene und antigene Bereiche eines Proteins lassen sich dadurch unterscheiden, daß vom nativen Protein erzeugte Antikörper mit synthetisierten antigenen Bereichen eines Proteins reagieren, jedoch kaum mit synthetisierten immunogenen Proteinbereichen. Das Beispiel des Hemagglutinin zeigt, daß entweder während der natürlichen Immunantwort Antikörper gegen nur wenige immundominante Stellen gebildet werden, oder daß synthetische Peptide stark konformationsabhängige, antigene Bereiche nicht exakt genug nachahmen können. Allein wichtig ist die Tatsache, daß synthetische Peptide in der Lage sind, Antikörper zu erzeugen, welche das native Protein erkennen, auch wenn diese Stellen immunrezessive Bereiche darstellen.

Peptide können in Lösung verschiedenste Konformationen annehmen und während der Immunantwort von den B-Lymphocyten in einer durchaus "proteinähnlichen" Konformation erkannt werden [44]. Es ist daher nicht notwendig, daß Peptide exakt die native Proteinkonformation annehmen. Die gebildeten humoralen (zirkulierenden) Antikörper erkennen das Protein ebenfalls nicht in einer starren, sondern in einer dynamischen Konformation. Es ist weiterhin denkbar, daß Antikörper,welche nicht exakt gegen ein natives Proteinstrukturelement gebildet sind, zuerst schwach ans Protein binden. Sie können dann am Protein eine Konformationsänderung herbeiführen, welche eine starke Bindung zur Folge hat [45]. Nach Schätzungen beträgt der Gehalt an proteinreaktiven Antikörpern in Antipeptidseren 0.1-1 %, was für Assays meist ausreichend ist, sofern die Affinität der Antikörper entsprechend groß ist. Um eine starke humorale Immunantwort zu erhalten, ist

neben der Bindung des Haptens (Peptid) an die Immunglobulinrezeptoren der B-Lymphocyten auch die Stimulierung der T-Lymphocyten notwendig. Diese wird einzig allein durch die Bindung des Carrierproteins an die T-Zellenoberflächenrezeptoren bewirkt [46].

3. Auswahl antigener Proteinsequenzen für die Synthese von Peptiden

Auf Grund eingehender Untersuchungen über den Zusammenhang von Immunreaktivität und Struktur am Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen und am Hemagglutinin konnten einige wichtige Auswahlkriterien für antigene Peptide aufgestellt werden [47]:

a) Das Peptid sollte eine größere Zahl polarer geladener Aminosäuren besitzen, denn hydrophile Sequenzen liegen meist auf der Proteinoberfläche und haben so Berührung zum wässrigen Milieu [48].

b) Peptide sollten aus mehr als 6 Aminosäuren bestehen, weil kleinere Peptide dazu neigen nicht mehr immunogen zu sein. Peptide mit mehr als 10 Aminosäuren besitzen hohe Wahrscheinlichkeit proteinreaktive Antikörper zu erzeugen.

c) Peptide, welche Prolin enthalten, das von polaren geladenen Aminosäuren umgeben ist, ergeben erfahrungsgemäß gute Antikörper. Prolin wird meist an exponierten Stellen, wie z.B. an Biegungen (β-Bends) der Polypeptidkette gefunden.

d) Oft sind die C-terminalen Peptide an der Proteinoberfläche lokalisiert und stellen wichtige antigene Determinanten dar. Für die Immunogensynthese werden diese Peptide spezifisch N-terminal an Carrier fixiert [49].

Entsprechendes, in geringerer Häufigkeit, findet man bei den N-Termini.

Seit neurer Zeit gibt es Computerprogramme mit welchen an Hand einer Hydrophilieskala der 20 Proteinaminosäuren die relative Polarität einer fortlaufenden Polypeptidkette bestimmt wird. Dies geschieht in der Weise, daß über die Hydrophilie von immer jeweils 5-9 Aminosäuren gemittelt wird. Auf diese Weise können innere und äußere Proteinregionen unterschieden werden [50]. Hopp und Woods [51-53] korrelierten in einem verbesserten Programm, nach Auswertung von 12 Proteinen, hydrophile Regionen mit der Antigenität. Es stellte sich dabei allerdings heraus, daß nicht alle antigenen Proteinregionen mit Hydrophiliemaxima zusammenfallen, und umgekehrt.
Kyte und Doolittle [54] verfeinerten eine Polaritätenskala unter Berücksichtigung der Hydrophobie und prägten den Begriff der "Hydropathie" (Gefühl für Wasser).
Wie erwähnt stellen "β-Bends" ebenfalls exponierte Oberflächenregionen dar.
Projiziert man alle Aminosäureseitenketten entlang einer α-Helix auf eine Ebene, so spaltet eine ideale Oberflächenhelix in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich auf ("helical wheel"). Solche Helices haben gewöhnlich immer immunogene oder sogar antigene Eigenschaften [21, 59].

Um solche α-Helices und β-Bends auf einer Polypeptidkette aufzufinden, ist es sinnvoll Methoden zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen zu entwickeln. Chou und Fasman [55, 56,58] stellten an Hand bekannter Proteinstrukturen statistische Berechnungen an, um helikale Strukturen, β-Strukturen und Knäuelstrukturen (random coil) vorauszusagen.

Die einzelnen Aminosäuren wurden auf ihre helix- (bzw. β-turn)-bildenden bzw. helix (bzw. β-turn)-brechende Eigenschaften hin untersucht, und jeder Aminosäure wurden Parameter zugeordnet. Demnach sind "β-bends" mit dem Vorhandensein der Aminosäuren Prolin, Asparagin, Asparaginsäure, Glycin und Serin verbunden, wobei Prolin meist die N-terminale Position eines "β-bend" besetzt, wie z.B. in Asn-Pro-Gly-X. Scheraga und Zimmermann legten für ihre Strukturaussagen die Berechnung der verschiedenen Konformationsenergien zu Grunde [57].

Alle aufgestellten mathematischen und empirischen Modelle sind lediglich Hilfsmittel bei der Suche nach antigenen Determinanten und sollten kombiniert angewendet werden. Die bestehenden Probleme und "Geheimnisse" im Zusammenhang von Struktur und Immunreaktivität können sie jedoch nicht lösen.

Als Fazit läßt sich feststellen, daß die ausgewählten, synthetisierten Peptide nicht unbedingt antigene Proteinregionen darstellen müssen, jedoch immunogene Bereiche sind, d.h., Antikörper gegen diese Bereiche müssen mit dem nativen Protein reagieren.

3.1. Strukturaussagen mittels CD-Messungen

Mit Hilfe des Circulardichroismus ist es möglich, die verschiedenen Sekundärstrukturen der Peptide und Proteine zu unterscheiden und zu analysieren [60]. Die Peptide sollten möglichst eine Länge von mehr als 10 Aminosäuren vorweisen.

So findet man bei typischen α-Helices einen negativen Circulardichroismus bei 223 nm ($n\pi^*$-Übergang). Der stark positive Cotton-Effekt bei 192-194 nm und der negative

bei 206-208 nm rühren von einem ππ*-Übergang her. Peptide mit antiparaller β-Konformation weisen bei 215-220 nm ein Minimum im CD-Spektrum auf (nπ*) und bei 195 nm ein Maximum (ππ*-Übergang) [61].
Die Knäuelstruktur (random coil, δ-Konformation) weist 2 Grundtypen von CD-Spektren auf. Bei einem Typ treten zwei CD-Übergänge mit entgegengesetztem Vorzeichen auf, während im Spektrum des anderen nur negative Elliptizitäten gefunden werden.

Die Heranziehung des Circulardichroismus zur Sekundärstrukturbestimmung bei Peptiden ist problematisch, sobald gleichzeitig mehrere Konformationen auftreten. Außerdem läßt sich bei Peptiden nur zwischen Helix, ungeordneter Struktur und β-ähnlicher Konformation unterscheiden, wobei über dem letzten Begriff parallele und antiparallele β-Struktur und die Reverse Turns [62] zusammengefaßt sind. Von den Standards abweichende Konformationen wie z.B. "β-bends" werden vernachlässigt.

4. Ankupplung der Peptide an Carrier

Um eine starke Immunantwort zu erhalten, müssen die ausgewählten und synthetisierten Peptide entweder an natürliche Träger (Proteine) oder an synthetische Träger (Copolymere von Polyaminosäuren) gekuppelt werden [1a]. Kupplungen sollten entweder spezifisch N- oder C-terminal erfolgen, je nachdem welches Ende für die Antikörperbildung frei sein muß. Möglichst zu vermeiden sind Kupplungen über die Seitenketten, weil diese für die Immunogenität meistens essentiell sind.Je spezifischer die Ankupplung, umso spezifischer sind die Antikörper.

Die kontrollierte Ankupplung wird vor allem dann wichtig, wenn die zu kuppelnden Peptide das C- oder N-terminale Ende eines Proteins bilden. Handelt es sich um innere Sequenzen, ist es üblich den N-Terminus zu acetylieren [63], und über das Carboxy-Ende zu kuppeln. Tyrosinhaltige Peptide haben den Vorteil der radioaktiven Markierung mit ^{125}Iod. Fehlt Tyrosin, wird dieses oder 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidester (Bolton-Hunter-Reagens) [64,65] zusätzlich als terminaler Baustein eingeführt. Heute gibt es eine derartige Fülle an Verbrückungsreagentien (Cross-Linker) [66,67], daß hier nur auf die wichtigsten und gebräuchlichsten eingegangen werden kann.

Für die Kupplungen stehen bei den Proteinen die Lys(NH_2), Cys(SH), Tyr(OH) und die COOH-Gruppen zur Verfügung. Bei den Peptiden kommen N-terminale Aminogruppen, C-terminale COOH-Gruppen, Lys(NH_2), Cys(SH) und Tyr(OH) Gruppen in Frage. Bei Proteinen oder Peptiden können z.B. durch Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid COOH-Gruppen, und durch Umsetzung mit 3-Mercaptobernsteinsäureanhydrid SH-Gruppen eingeführt werden [68]. Grundsätzlich gilt es zwischen zwei Arten von Crosslinkern zu unterscheiden:

a) homobifunktionelle
b) heterobifunktionelle.

zu a)
Wichtige homobifunktionelle Reagentien für Amino-Aminokupplungen sind Glutardialdehyd [49,66], Diisocyanate [69] und Diimidoester [67].
Für Kupplungen zwischen zwei Mercaptogruppen kommen Dimaleimidderivate [67] und bestimmte Aryl- und Alkylhalogenide [67] (z.B. Diiodoacetamidgruppen) in Frage.

Kupplungen zwischen Amino- und Carboxygruppen werden meist mittels wasserlöslichen Carbodiimiden [70] durchgeführt.

Homobifunktionelle Reagentien haben den Nachteil, daß es zur Quervernetzung vom Träger und zur Bildung von Peptid-oligomeren kommen kann. Diese Gefahr wird durch zusätzlich im Peptid vorhandene, ungeschützte NH_2-, SH- oder COOH-Gruppen verstärkt.
zu b) Aus diesen Gründen ist man in den letzten Jahren dazu übergegangen, Reagentien zu entwickeln, welche auf jeder Seite eine verschiedene Funktionalität aufweisen. Solche heterobifunktionelle Reagentien [71] reagieren z.B. in der ersten Stufe mit SH-Gruppen von Proteinen und in einem nachfolgenden zweiten Schritt mit NH_2-Gruppen von Peptiden und umgekehrt. Diese Quervernetzer führen meist zu definierten Konjugaten für Immunisierungen. Für Reaktionen mit Aminofunktionen kommen Gruppen in Frage, wie Aktivester, z.B. N-Hydroxysuccinimidester, Säureazide und Arylazide (diese reagieren nach vorhergegangener Photoaktivierung). Mercaptogruppen reagieren bevorzugt mit S-Thiopyridyl- und Maleimido-Derivaten, sowie mit Alkyl-, Arylhalogenid wie z.B. Iodacetamidogruppen (bei $pH \leq 7$ Reaktion mit SH-Gruppen, bei $pH \geq 8$ Reaktion mit NH_2-Gruppen).

Auf der Basis der verschiedenen Funktionalität wurden leistungsfähige Crosslinker entwickelt, wie z.B. N-Succinimidyl-3-(2-dithiopyridyl)-propionat (SPDP) [72], m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester [73], 3-Maleimidopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester [74], N-Succinimidyl-(4-iodoacetyl)aminobenzoat [75] und N-(4-Azidobenzoylglycyl)-S-(2-thiopyridyl)cystein (AGTC) [76]. AGTC hat einige interessante Merkmale: Die Azidobenzoylgruppe reagiert nach Photoaktivierung mit Aminogruppen, die Thiopyridyl-Gruppe mit SH-Gruppen, der Glycyl-Rest kann leicht

radioaktiv markiert eingeführt werden, und Cystein verleiht dem Reagens wasserlösliche Eigenschaften.

Andere Reagentien wie Bisdiazobenzidine [66,77] verbinden die Tyrosin-Reste von Proteinen und Peptiden durch Diazokupplung. 4-Nitrobenzoylazid reagiert zuerst N-terminal mit Peptiden. Nach Reduktion der Nitrogruppe und anschließender Diazotierung erhält man das kupplungsfähige Diazoniumsalz [78].

Werden Peptide an einem festen Träger aufgebaut, ist es oft üblich diese hydrazinolytisch abzuspalten [79], oder von vornherein den Peptidaufbau an einem säurelabilen Hydrazid-Anker [80] durchzuführen. In beiden Fällen erhält man Hydrazide, welche nach Überführung ins Azid C-terminal gekuppelt werden können.

Für N-terminale Kupplungen eines Peptids, wurde während dieser Arbeit u.a. ein neues Crosslinkingreagens entwickelt, welches direkt als letzter Baustein in die Peptidsynthese eingeführt wird, und Kupplungen über ein Säureazid ermöglicht (siehe dazu Kap. E.).

Es gibt kein universell einsetzbares Crosslinking-Reagens. Je nach Peptidsequenz und Ankupplungsmodus wird man das eine oder andere bevorzugt anwenden. Oft ist es von Vorteil, wenn durch das Verbrückungsreagens ein Spacerglied eingeführt wird, das selbst keine immunogenen Eigenschaften besitzt (z.B. eine unverzweigte Alkylengruppe). Die Auswahl des geeigneten Crosslinker sollte mit Blick auf spätere Kupplungen an Gelmaterialien (zur Affinitätschromatographie) getroffen werden. In Frage kommen hier z.B. CNBr-aktivierte Sepharose, Amino-, Carboxy- und Thiopropyl-Sepharose. Eine 4-7 gliedrige Verbrückung zwischen Träger und Peptid ist von Vorteil [127].

Die Bestimmung der Peptidbeladung an Carriern kann durch radioaktive Markierung des Peptids oder mittels ASA erfolgen, sofern die absolute Aminosäurezusammensetzung des Proteins bekannt ist. Je nach Molmasse des Peptids betragen die Beladungen 4-20 Mol Peptid pro Mol Serumalbumin.

5. Auswahl des Carrier

Die größte Rolle als natürliche Carrier spielen Rinder(BSA)- und Human(HSA)-Serumalbumin [1a,81]. Der Vorteil dieser Träger liegt in der Wasserlöslichkeit der Konjugate, sowie in der relativ guten Immunantwort in artfremden Species. Eine sehr starke Immunantwort geben Hemocyanin (KLH)-Konjugate. Diese sind jedoch nicht mehr wasserlöslich. Gute Träger für Immunogene sind auch Thyreoglobuline und γ-Globuline verschiedener Species [1a].

Bei den synthetischen Trägern spielen Polyaminosäuren, wie z.B. Polylysin, wegen ihrer schlechteren Immunogenität heutzutage keine Rolle mehr. Hingegen konnten sich Copolymere wie poly(D,L-Ala)----poly(L-Lys) für die Darstellung vollsynthetischer Immunogene durchsetzen [83].

6. Adjuvantien

Für Immunisierungen an Tieren hat sich bisher Freund's Adjuvant am besten bewährt. Bemühungen sind jedoch im Gange dieses wenig angenehme Adjuvans zu ersetzen. Als erstes synthetisches Adjuvans hat sich Muramyldipeptid (N-Acetylmuramyl-alanyl-isoglutamine) [85] gut bewährt. Es wurde bei der Herstellung des ersten vollsynthetischen Impfstoffs gegen Diphterie [30] zusammen mit einem Peptid kovalent an poly(D,L-Ala)----poly(L-Lys) gekuppelt. Das

erhaltene Konjugat ist wasserlöslich. Allerdings ist MDP sehr teuer.

7. Assays für Antikörper

Eine moderne, empfindliche und quantitative Methode zur Austestung von Antipeptidseren stellt der ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) [86,87] dar. Im Gegensatz zum bekanntesten Immunoassay, dem Radioimmunoassay (RIA) [88], wo mit radioaktiver Markierung gearbeitet wird, arbeitet der ELISA mit Enzymmarkierung. Dies bedeutet, daß je nach Assaysystem (competitiv oder nicht competitiv) das Antigen, der entsprechende Antikörper oder Doppelantikörper (z.B. anti-Ka-IgG aus Schafen) kovalent mit einem Enzym (alkal. Phosphatase, Meerrettichperoxidase) gebunden wird.

Zum Antikörpernachweis gegen ein Peptid wird z.B. das wasserlösliche Protein-Peptid-Konjugat an die Plastikwand von Mikrotiterplatten adsorbiert oder kovalent gebunden. Wegen der schlechten Adsorption ist die Beschichtung mit niedermolekularem Antigen nicht empfehlenswert [21].

Nach Zugabe des Antipeptidserums in verschiedenen Verdünnungen, werden ungebundene Antikörper weggewaschen. Nun erfolgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der spezifisch ist gegen IgG (Immunglobulin) des immunisierten Tieres. Dieser enzymmarkierte zweite Antikörper kann an vorhandene Peptidantikörper binden. Nach Zugabe eines entsprechenden Enzymsubstrats (z.B. p-Nitrophenylphosphat für alkal. Phosphatase) wird das Vorhandensein eines Peptidantikörpers durch eine Farbreaktion spektralphotometrisch detektiert (Doppelantikörper-Sandwich-Assay, Abb. A.2).

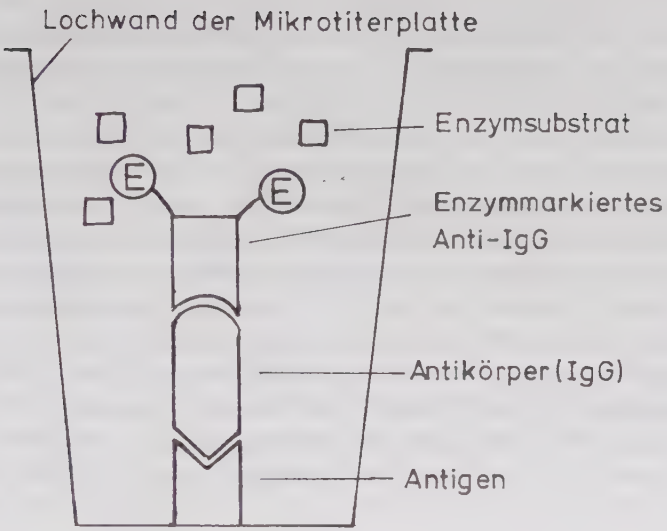


Abb. A.2: Doppelantikörper-Sandwich-Assay

Soll freies Peptid in einer Probe bestimmt werden, wird entweder ein competitiver ELISA [89,90] (Verdrängungsassay, vgl. Kap. F.6.8)oder ein indirekter, nicht competitiver ELISA [91] aufgebaut.

In vielen Fällen will man ein virales oder zelluläres Protein nachweisen (vgl. Kap. D). Der direkte Weg dahin ist Immunpräzipitation des radioaktiv markierten Zellextrakts mit Antikörpern und anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) vom Präzipität. Zur Kontrolle fällt man in Gegenwart eines großen Überschußes an Peptid.

Von Antipeptidseren werden eher sequenzspezifische als konformationsspezifische Determinanten erkannt [92]. Es kann daher durchaus sein, daß Antiseren an denaturiertes

und nicht an natives Protein binden. Denaturierung erfolgt z.B. bei der Gelektrophorese in SDS (sodium dodecyl sulfate) (vgl. Kap. D).
Infolge der einfachen Handhabbarkeit und Empfindlichkeit hat sich der ELISA in vielen Bereichen als gleichwertige Methode zum RIA erwiesen, wo mit ^{125}Iod und ^{3}H-Markierung gearbeitet wird. Empfindlichkeitssteigerungen beim ELISA waren dadurch möglich, daß z.B. zur Herstellung von Peptid-Tracern (markiertes Peptid) fluorogene bzw. chromogene Substrate spezifisch an das Peptid gekuppelt wurden [74]. Ein Problem beim herkömmlichen competitiven ELISA bilden die enzymmarkierten Tracer. Durch die Markierung mit dem relativ großen Enzym wird die Erkennung und Bindung des Antikörpers an das kleine Peptidantigen erschwert bzw. unmöglich gemacht.

Zusätzlich zu den ELISA- und RIA-Techniken gibt es Fluoreszenz- und Lumineszenzimmunoassays. Die Markierung geschieht hier mit Labeln wie Fluoreszeinisothiocyanat [93, 94] oder Luminolderivaten [95,96]. Mit diesen Techniken werden auch kleinere Tracer erfaßt.

8. Problem der Kreuzreaktivität

Antipeptidseren können mit anderen Peptiden oder Proteinen kreuzreagieren. Beispielsweise reagieren polyclonale Antikörper, welche gegen das C-terminale Hexapeptid [13], bzw. monoclonale Antikörper, die gegen das entsprechende Tetrapeptid [97] vom TMV-Hüllprotein des Stammes vulgare gerichtet sind, ebenfalls mit den Hüllproteinen der Stämme TMV dahlmense und Holmes'Ribgrass. Dies ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Prolin zurückzuführen, welches für die Ausbildung eines "turns" verantwortlich ist. Die Antikörper würden in diesem Fall nur die vorhandene "turn"-Struktur erkennen, jedoch nicht zwischen Thr und Ser sowie Gly und Ala unterscheiden:

TMV-Stamm	
vulgare	Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr
dahlemense	Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Ser
Holmes' Ribgrass	Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Thr

Allgemein wurde festgestellt, daß Antiseren gegen kleinere C-terminale Peptide von TMV vulgare stärker kreuzreagieren als Antikörper, welche gegen ein entsprechend längeres Peptid gebildet wurden.

Erstaunlicherweise wurden Kreuzreaktionen auch bei monoclonalen Antikörperngefunden, obwohl hier eine größere Spezifität erwartet wird [98-100]. Crawford et al. entdeckten, daß alle kreuzreagierenden monoclonalen Antikörper gegen Determinanten gerichtet sind, welche gegen Denaturierung unempfindlich sind [99]. Da Antipeptidseren wahrscheinlich ebenfalls gegen denaturierungsunempfindliche (sequenzspezifische) Determinanten gerichtet sind, sind die Probleme ähnlich denen bei monoclonalen Antikörpern. Allgemein läßt sich sagen, je bedeutender die Konformation für die Antigen-Antikörperreaktion ist, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit für Kreuzreaktionen.

9. Proteinreinigung

Peptide und Peptidantikörper können zur affinitätschromatographischen Reinigung von Antikörpern und Proteinen benutzt werden [101]. Nach Kupplung des Peptids an Sepharose wird die IgG-Fraktion (Antikörper enthaltende Fraktion) des Antipeptidserums abgetrennt. Die Ablösung der Antikörper kann z.B. durch Elution mit Peptid in isotonischer Salzlösung bei neutralem pH oder durch pH-Gradientenelution erfolgen. Die gereinigten Antikörper werden nun an aktivierte Sepharose gebunden und mit der Proteinmischung

(z.B. Zellextrakt) inkubiert. Gebundenes Protein kann wiederum durch Elution mit einem Überschuß an Peptid von der Säule abgelöst werden.
Die Elution mit Peptid ist geeignet um das Protein im nativen funktionalen Zustand zu erhalten. Manchmal müssen aber auch nicht denaturierende Detergentien zur Ablösung von Antikörper oder Protein benützt werden.

10. Peptidsynthesen

Für den schnellen Aufbau, vor allem größerer Peptide, hat die Synthese an einem festen Träger nach der Merrifield-Technik [102] gewisse Vorteile gegenüber der klassischen Methode, wenngleich die Reinigungsprozeduren nach der Abspaltung des Peptids vom Träger oft aufwendig und mühsam sind. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Trägerharze und Ankergruppen geschaffen, die eine weniger drastische Peptidabspaltung erlauben, als z.B. mit HBr/AcOH oder HF [103]. Harze mit weniger starker Vernetzung (1 % statt 2 %) ergeben bessere Quelleigenschaften und Kinetik. Das von Sheppard [104] et al. entwickelte polare Polyamid-Trägerharz hat in DMF hervorragende Quelleigenschaften, dadurch sollen Löslichkeitsunterschiede zwischen Trägermatrix und Peptidkette reduziert werden. Die geringeren sterischen Effekte während der Kupplung und eine verbesserte Kinetik sind die Folge [105]. Bei den von Bayer und Mutter entwickelten Polystyrol-Polyoxyethylen-Trägern (PS-POE) findet die Peptidkupplung in homogener Phase statt [106].

Zur milden Peptidabspaltung vom makromolekularen Träger werden spezielle Anker zwischen Peptid und Polymer eingebaut. So wird der p-Alkoxybenzylalkohol-Anker [80,118] mit 50 % TFE/CH_2Cl_2 abgespalten, beim 4-Hydroxy-3-methoxy-

phenoxyacetyl-Anker genügt bereits 1 % TFE, was die Darstellung partiell geschützter Peptide erlaubt [107]. Geschützte Peptide mit C-terminalem Hydrazid (zur Fragment-Kupplungen über das Azid) erhält man auch bei der hydrazinolytischen Abspaltung, bzw. solche mit freier Carboxygruppe bei der photolytischen Abspaltung an verschiedenen Ankern [108-110].
Die Kombination der alkalilabilen Fmoc-Schutzgruppe [111-115] in Verbindung mit säurelabilen Ankern brachte eine methodische Bereicherung in der Festphasenpeptidsynthese [116-122]. Anwendung findet die Fmoc-Schutzgruppe z.B. auch bei speziellen Problemen in der klassischen Synthese [134,135].

In dieser Arbeit wurden die Peptide an einem p-Alkoxybenzylalkohol-PS-DVB (1 %) mit N_α-Fmoc-Aminosäuren und säurelabilem Seitenkettenschutz (tBu, OtBu, Boc) aufgebaut [129]. Bei der Darstellung der Fmoc-Aminosäuren mit Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Chlorid) werden als Verunreinigung allerdings Dipeptide festgestellt [123]. Diese können sich über ein intermediär entstandenes gemischtes Säureanhydrid ausbilden. Es empfiehlt sich daher Fmoc-Chlorid durch Fluorenylmethyl-succinimidylcarbonat [123] zu ersetzen.

Beobachtungen von Bodanszky et al. zeigen eine gewisse Labilität der Fmoc-Gruppe bei Hydrierungen [124]. Insbesondere sollten auch die für Kupplungsreaktionen eingesetzten Lösungsmittel (DMF) und tertiäre Amine von sekundären Aminen befreit werden, da diese ebenfalls zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe führen [125].

Will man Peptide in größeren Mengen und unter kontrollierten Bedingungen darstellen, so ist unbedingt der schrittweise Peptidaufbau nach der klassischen Methode [130] vorzuziehen.

Eine bewährte Synthesestrategie verwendet die orthogonale Schutzgruppenkombination [131] säurelabiler Gruppen (Boc, tBu, OtBu) in Verbindung mit hydrogenolytisch abspaltbaren Gruppen (Z, Bzl, OBzl). Kupplungen werden meist nach der nahezu racemisierungsfreien DCC/HOBt-Methode [133] oder mit isolierten geschützten Aminosäure- bzw. Peptidyl-N-hydroxy-succinimidestern [132] durchgeführt.

11. Problemstellung

Die Möglichkeit mit Hilfe von Peptid-Antikörpern Proteine, deren Wirkort, Funktion und antigene Determinanten zu bestimmen, öffnet neue Wege in der Proteinanalytik und Immunchemie.

Ziel dieser Arbeit ist es, antigene Peptidsequenzen von bekannten und auch von bisher nur aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteinen zu synthetisieren. Gegen einige der synthetischen Peptide sollen Antikörper erzeugt werden, mit denen die Proteine bestimmt bzw. gesucht werden sollen. Zum anderen sollen synthetische Peptide nach Bindung an eine polymere Matrix in einem Immunoassay zur Spezifitätsbestimmung von poly- und monoclonalen Antikörpern verwendet werden.

Im einzelnen sollten folgende Probleme bearbeitet werden.

1) Die bisherige immunologische Bestimmung von Interferonen erfolgte weitgehend mit Antiseren gegen natives Protein. Nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur ist nur α- und β-IFN in ausreichenden Mengen vorhanden um Antiseren produzieren zu können. Das γ-Interferon wurde bisher nur in kleinsten Mengen erhalten. Neben α, β, γ-IFN sind in der Zwischenzeit noch eine Reihe weiterer Interferone über ihren genetischen Code bekannt [139].

Es soll eine Methode entwickelt werden, mit welcher an Hand von Peptidantikörpern tryptisch gespaltenes Interferon immunologisch bestimmt werden kann. Diese Antikörper sollen gegen kurze synthetische Peptide gerichtet sein, welche bei der rein formalen tryptischen Spaltung des zu bestimmenden Interferon entstehen würden.

2) Auf einem sequenzierten Stück der DNA des Pilzes Neurospora crassa [135] gibt es mehrere Genabschnitte von denen nicht bekannt ist, ob sie exprimiert werden, d.h. man weiß nicht, ob es für sie ein entsprechendes Protein gibt. Mit Hilfe eines Computerprogramms können die Sekundärstruktur und Hydrophilie vorhergesagt und damit die antigenen Bereiche ermittelt werden. Mit Antikörpern gegen ausgesuchte und synthetisierte antigene Proteinregionen (Nona- und Tetradecapeptide) sollte es möglich sein, evtl. ein neues Protein nachzuweisen.

3) Es ist bekannt, daß das C-terminale Ende des Tabak-Mosaik-Virus-(TMV)-Hüllproteins eine antigene Determinante darstellt [136]. Erzeugt man polyclonale und monoclonale Antikörpergegen das TMV-Virus bzw. gegen das Hüllprotein, stellt sich die Frage gegen welchen Bereich des Proteins die Antikörper gerichtet sind. Das C-terminale Tetrapeptid des Hüllproteins soll synthetisiert werden, um mit Hilfe von Polylysin- und HSA-Tetrapeptidkonjugaten die Spezifität und Immunreaktivität der mono- und polyclonalen Antikörper zu bestimmen.

4) Um Peptide unter möglichst milden Bedingungen spezifisch N-terminal an Polymere/Biopolymere kuppeln zu können, sollte ein neues heterobifunktionelles Crosslinking-Reagens entwickelt werden. Das Reagens sollte dabei direkt zur Peptidsynthese verwendet werden können, indem es als N-terminaler Baustein eingebaut wird.

B. IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VERSCHIEDENER INTERFERON-TYPEN

Interferone haben in den letzten Jahren in der Medizin wegen ihren antiviralen und z.T. antiproliferativen (tumorhemmenden) Eigenschaften verstärkt Aufmerksamkeit erlangt [137,138].

Interferon kommt in äußerst geringen Mengen in menschlichen Fibroblasten und Lymphocyten vor und wurde bis vor einigen Jahren aus menschlichem und tierischem Blut gewonnen. Die großen Fortschritte in der Gentechnologie machten es möglich, Interferongene (cDNA's) in Plasmide einzubauen, welche ihrerseits in E. coli Bakterien eingeschleust werden [139]. Das veränderte Bakterium erzeugt identische Tochterzellen (Bakterienclone), welche Interferon produzieren. Es gilt nun die interferonproduzierenden Kolonien herauszufinden, d.h. das Glycoprotein Interferon muß neben einer Vielzahl anderer Proteine spezifisch bestimmt werden können.

Neben den drei Klassen von Interferonen (α-, β-, γ-IFN) gibt es allein in der α-IFN-Familie noch weitere 12 Interferontypen [140]. Diese Tatsache verstärkt noch mehr die Notwendigkeit, Assays zu entwickeln, mit deren Hilfe Interferone typspezifisch, schnell und zuverlässig nachgewiesen werden können.

Gegen α-Interferon, welches in größeren Mengen zugänglich ist, konnten durch Immunisierung von Kaninchen mit nativem α-IFN polyclonale und monoclonale Antikörper erhalten werden. Mittels eines Festphasen-Sandwich-Assays und zwei monoclonalen Antikörpern, konnte das Leukocyten-Interferon (α-IFN) im atto-Mol (!)-Bereich nachgewiesen werden [141].

Auf der anderen Seite wurden die N-terminalen Sequenzen von α-IFN (1-10) [79] und β-IFN (1-13) [142,143] und ver-

schiedene Konjugate synthetisiert. Mit Antikörpern gegen die synthetisierten Peptide [144] konnte z.B. β-IFN in einem Radioimmunoassay bestimmt und affinitätschromatographisch gereinigt werden.

In dieser Arbeit sollte ein neuer Weg zur immunologischen Bestimmung von Interferonen beschritten werden. Da die meisten Interferongene sequenziert sind und die Primärstruktur bekannt ist, ist es möglich, diejenigen Spaltstücke (Peptide) vorauszubestimmen, welche bei der tryptischen Spaltung einer definierten Interferonsequenz entstehen würden. Mit Antikörpern gegen ein ausgesuchtes Spaltpeptid sollte es möglich sein, ein entsprechendes tryptisch gespaltenes Interferonprotein spezifisch in einem Immunoassay bestimmen zu können. Es ist bekannt, daß bei Immunoassays, wo ein bestimmtes natives Protein nachgewiesen wird, oft Wechselwirkung mit anderen Proteinen, z.B. fremden Antikörpern oder Komplementfaktoren auftreten [145]. Solche Wechselwirkungen sind bei Assays mit gespaltenen Proteinen nicht zu erwarten, was eine Erhöhung der Spezifität bedeuten würde [146].

Geht man davon aus, daß Trypsin spezifisch nach Arginin und Lysin spaltet, bevorzugt dann wenn polare Aminosäuren benachbart sind, erhält man mehr oder weniger große Spaltstücke. Es wurden solche Peptide zur Synthese ausgewählt, deren Aminosäure-Sequenz zum einen immunogene Eigenschaften verspricht, polare Aminosäuren enthält (wegen Wasserlöslichkeit) und zum anderen eine für den Interferontyp spezifische Sequenz darstellt.

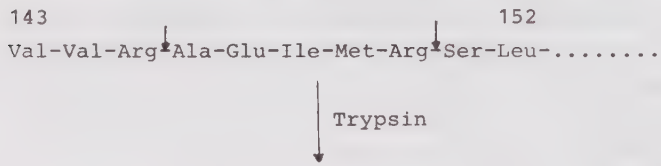
Um einen Vergleich zu bestehenden Immunoassays für α-IFN (Leukocyteninterferon) machen zu können, wurde zuerst ein Pentapeptid aus dem C-Terminus von α-IFN synthetisiert, welches bei der tryptischen Spaltung als Ganzes herausgespalten werden sollte. Als weiteres wurde ein Penta- und

Heptapeptid von γ-IFN synthetisiert. Für γ-Interferon, das nur in geringen Mengen darstellbar ist, gibt es noch keinen Immunoassay.

1. Auswahl der Interferonsequenzen

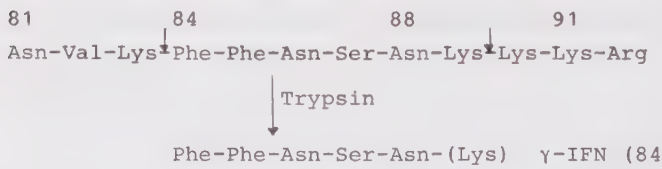
1.1. α-IFN-5 (146-150): Ala-Glu-Ile-Met-Arg

Die Sequenz von α-IFN-5 ist allen Leukocyteninterferonen gemeinsam und ist für einen Gruppenassay geeignet. Das Pentapeptid sollte bei der folgenden tryptischen Spaltung entstehen:



1.2. γ-IFN-5 (84-88): Phe-Phe-Asn-Ser-Asn [139]

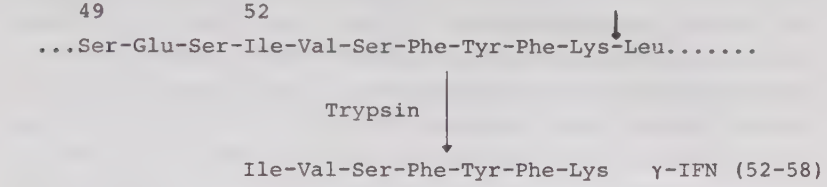
γ-IFN-5 ist eine Teilsequenz eines Bruchstücks, welches bei der tryptischen Spaltung von γ-IFN entsteht:



Es wurde lediglich das Pentapeptid (84-88) ohne Lys_{89} synthetisiert, um eine spezifischere Ankupplung über die Asn-COOH-Gruppe zu erhalten. Die ε-NH_2-Lysin-Gruppe würde bei der Kupplung mit Carbodiimid zusätzliche Nebenreaktionen verursachen. Andererseits ist Lysin für die immunogenen Eigenschaften eines Peptids oft essentiell.

1.3. γ-IFN-7 (52-58): Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys [139]

Mit der Sequenz γ-IFN-7 wurde ein weiteres tryptisches Peptid von γ-IFN synthetisiert. Es ist wiederum nur eine Teilsequenz eines Spaltstücks:



Vor dieser Teilsequenz folgen weitere 7 Aminosäuren bis zu einer Spaltstelle am Lysinrest der Position 46. γ-IFN-7 enthält im Gegensatz zu γ-IFN-5 noch C-terminales Lysin. Lysin selbst und die längere Sequenz könnten dazu beitragen, bessere und spezifischere Antikörper zu erhalten als beim kürzeren γ-IFN-5 ohne Lysin.
Da die Sequenz von γ-IFN-7 bei Ile abgebrochen ist, sollte das Heptapeptid über den N-Terminus an Proteine gekuppelt werden.

2. Synthesen der Interferonpeptide

2.1. Ala-Glu-Ile-Met-Arg (α-IFN-5)

α-IFN-5 wurde an einem PS-DVB (1 %)-Träger mit dem säurelabilen p-Alkoxybenzylalkoholanker aufgebaut. Es wurden bis auf Boc-Ala-OH nur N_α-Fmoc-geschützte Aminosäuren mit tert.-Butyl-Seitenkettenschutz verwendet. Arginin wurde durch Protonierung geschützt [147,148]. Da unter den alkalischen Abspaltungsbedingungen (55 % Piperidin/DMF) die Protonierung der Guanidinogruppe aufgehoben wird, muß mit einem Überschuß an Pyridinhydrochlorid wieder protoniert werden. Die dabei ebenfalls protonierte N_α-

Aminogruppe wird mit N-Methylmorpholin (pKa = 10.5) für den nächsten Kupplungsschritt deprotoniert. Die Guanidinofunktion (pKa = 12.4) bleibt unter diesen Bedingungen protoniert. Es ist wichtig, daß frisch synthetisiertes N_α-Fmoc-Arg-OH zur Kupplung an den Träger eingesetzt wird, da bei der Aufbewahrung von N_α-Fmoc-Arg-OH durch Fmoc-Abspaltung freies Arg entsteht. Der Protonierungsschutz für Arg hat sich bei der Synthese als völlig ausreichend erwiesen. Nach 2.5 h Abspaltung mit 50 % TFA/CH_2Cl_2 wird ca. 90 % reines Pentapeptid in guten Ausbeuten erhalten.

Die Endreinigung des hydrophilen, ungeschützten Peptids gelingt unter hohen Ausbeuteverlusten (~ 50 %) mittels Verteilungschromatographie im Zweiphasensystem (1-Butanol/AcOH/H_2O 4:1:5) an Sephadex G-10.

2.2. Phe-Phe-Asn-Ser-Asn (γ-IFN-5)

γ-IFN-5 wurde mit der gleichen Synthesestrategie wie α-IFN-5 aufgebaut. Fmoc-Asn-OH wurde via DCC/HOBt gekuppelt um Dehydratisierung zum Nitril zu vermeiden. Bei einer versuchsweisen Abspaltung des geschützten N_α-Fmoc-γ-IFN-5 stellte sich heraus, daß das Fmoc-geschützte Pentapeptid wegen seiner Unlöslichkeit nicht zur Kupplung ans Protein geeignet war. Es wurde deshalb das ungeschützte γ-IFN-5 dargestellt, welches in schlechten Ausbeuten (20 %) erhalten wurde und sich lediglich in DMSO und im alkalischen Medium ($pH \geq 8$) als Salz löste. Nicht erklärt werden kann der starke Rückgang der Peptidbeladung am Harz nach der Kupplung von Fmoc-Ser(tBu)-OH. Möglicherweise bildet sich nach der alkalischen Fmoc-Abspaltung am Asn ein cyclisches Imid, welches im nachfolgenden Kupplungsschritt schlecht weiterreagiert [148a].

Die lange Behandlung mit Trifluoressigsäure während der Abspaltung des Peptids vom Harz, gibt Anlaß zu Nebenreaktion, wie der erwähnten Imidbildung [149,149a] und α-β-Transpeptidierung [150]. Mit der Dünnschicht- und hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie lassen sich 5-10 % einer lipophilen Verunreinigung erkennen. Diese kann mittels präparativer Gelchromatographie an Sephadex G-15 (0.1 mol NH_4HCO_3, pH = 8.6) nur teilweise abgetrennt werden. Vollständige Reinigung ist nur mit HPLC möglich (vgl. Kap. F.2.6., Abb. F.2). Das Nebenprodukt zeigt die gleiche Aminosäurenanalyse wie das Hauptprodukt. Da dadurch eine Fehlsequenz ausgeschlossen werden kann, erhärtet sich der Verdacht, daß eine der oben erwähnten Nebenreaktionen eingetreten ist.

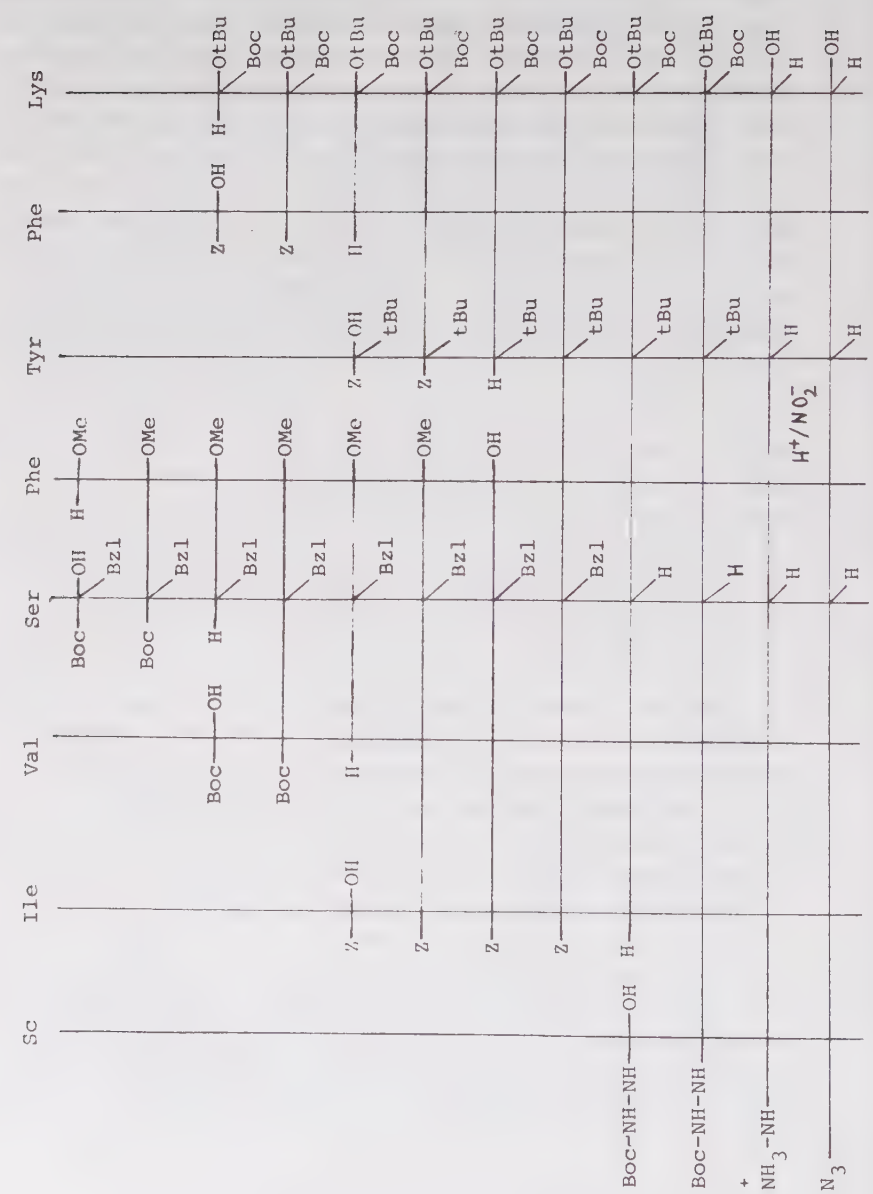
Um festzustellen, ob eine Cyclisierung an einem Asparagin eingetreten ist, wurde ein enzymatischer Abbau mit Carboxypeptidase A durchgeführt. Das lipophile Nebenprodukt wurde jedoch vollständig abgebaut. Die Aminosäurenanalyse des verdauten Peptids samt Verunreinigung zeigte das richtige Verhältnis für 2 Phe, und 1 Ser, Asn jedoch fehlte.

Das fehlende Asparagin konnte erst nach saurer Hydrolyse (6 N HCl, 24 h bei 110°C) des bereits verdauten Peptidrückstandes identifiziert werden. Bislang einzige Erklärungsmöglichkeiten für dieses Phänomen scheint eine enzymatische Synthese zum Dipeptid Asn-Asn zu sein oder eine enzymkatalysierte Cyclisierung zum Imid.

2.3. Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys (γ-IFN-7)

Die Sequenz von γ-IFN-7 wurde nach der klassischen Methode durch Verwendung von tert. Butyl- und Benzyl-Schutzgruppen (Abb. B.1) aufgebaut. Die Serin-OH-Gruppe wurde als Benzyl-

Abb. B.1: Syntheseschema von γ-IFN-7



ether geschützt, da bereits während der Hydrierung von Z-Ser(OtBu)-Phe-OMe und bei der Aufarbeitung des hydrierten Dipeptidesters nennenswerte Diketopiperazinbildung stattfand [151]. Nach Fragmentkondensation von Z-Ile-Val-Ser(OBzl)-Phe-OH mit H-Phe-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-OtBu via DCC/HOBt wird in guten Ausbeuten das vollgeschützte Heptapeptid erhalten. Im Gegensatz zur N_{α}-Z-Schutzgruppe am Ile läßt sich die Benzyl-Schutzgruppe am Serin auch nach längerem Hydrieren nicht quantitativ entfernen. Nach Reinigung des unvollständig hydrierten Heptapeptids über LH-20 wird N-terminal der Crosslinker Boc-HSc-OH gekuppelt. Durch dreistündige Behandlung der Crosslinker-Peptidverbindung mit Trifluoressigsäure erhält man das freie Hydrazidosuccinyl-Heptapeptid (HSc-γ-IFN-7). Dieses kann mit H^+/NO_2^- leicht in das kupplungsfähige Azid übergeführt werden.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen von dem gereinigten Hydrierungsprodukt H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-OtBu mit Trifluoressigsäure (3 h), erhält man das ungeschützte Heptapeptid γ-IFN-7, welches sich in 50 % Eisessig und Dimethylsulfoxid löst, in anderen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Methanol und Tetrahydrofuran schwerlöslich ist, bzw. gallertartig erstarrt.

2.4. Racemisierungstests der Interferonpeptide

Die synthetisierten Interferonsequenzen α-IFN-5, γ-IFN-5 und γ-IFN-7 wurden über die N_{α}-Pentafluoropropionyl-n-propylester gaschromatographisch an Chirasil-Val [191] bestimmt. Die Racemisierung bei den nach der Festphasenmethode dargestellten Peptiden (maximal bei 0.3 % D-Asn) lag wider Erwarten etwas höher als bei dem klassisch synthetisierten Heptapeptid (maximal bei 0.02 % D-Glu). Dies dürfte am gekauften Aminosäurederivat liegen.

3. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

3.1. ^{13}C-NMR-Spektrum von α-IFN-5

Einen wertvollen Synthese- bzw. Strukturbeweis für α-IFN-5 bietet das ^{13}C-NMR-Spektrum (100.1 MHz), welches in D_2O aufgenommen wurde (Abb. B.2). Signifikant erscheinen die Signale von Arg-Guanidino-C_ε bei 159.3 ppm und Arg-C_δ bei 43.2 ppm. Die Signale von Ile-C_δ (CH_3) bei 12.5 ppm und Ile-C_α bei 60.9 ppm deuten ebenfalls auf die richtige Struktur hin. Infolge Protonierung ist das Ala-C_β-Signal bei 19.2 ppm nach tiefem Feld verschoben.

3.2. ^{13}C-NMR-Spektrum von γ-IFN-5

Von γ-IFN-5 wurde ein J-moduliertes Spin-Echo-^{13}C-NMR-spektrum in DMSO-d_6 aufgenommen (Abb. B.3). Für die Messung stand wegen der bereits erwähnten Reinigungsprobleme nicht genügend hochgereinigtes Produkt zur Verfügung. Die Reinheit des vermessenen Peptids lag bei 90-95 % (DC, HPLC) und war ausreichend um eindeutig das richtige Syntheseprodukt identifizieren zu können. Die Signale von Asn-C_β (36.8 und 37.0 ppm), Asn-C_α (49.2 und 50.2 ppm), Phe-C_β (37.4 und 37.5 ppm) und Phe-C_α (54.7 und 55.3 ppm) sind schwach aufgespalten, was vom doppelten Vorhandensein dieser Aminosäuren herrührt. Ebenfalls Doppelstruktur zeigen die Signale der aromatischen C-Atome. Signifikant sind auch die Resonanzen von Ser-C_α bei 53.4 ppm und Ser-C_β bei 61.8 ppm. Die kleinen Signale neben den Hauptpeaks von Asn-C_β, Asn-C_α, Phe-C_α und Phe-C_β, welche im Carbonyl- und teilweise auch im aromatischen Bereich erscheinen, deuten auf die nicht exakt bekannte Verunreinigung hin.

Abb. B.2: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.1 MHz, 31500 scans) von α-IFN-5 (146-150) in D_2O

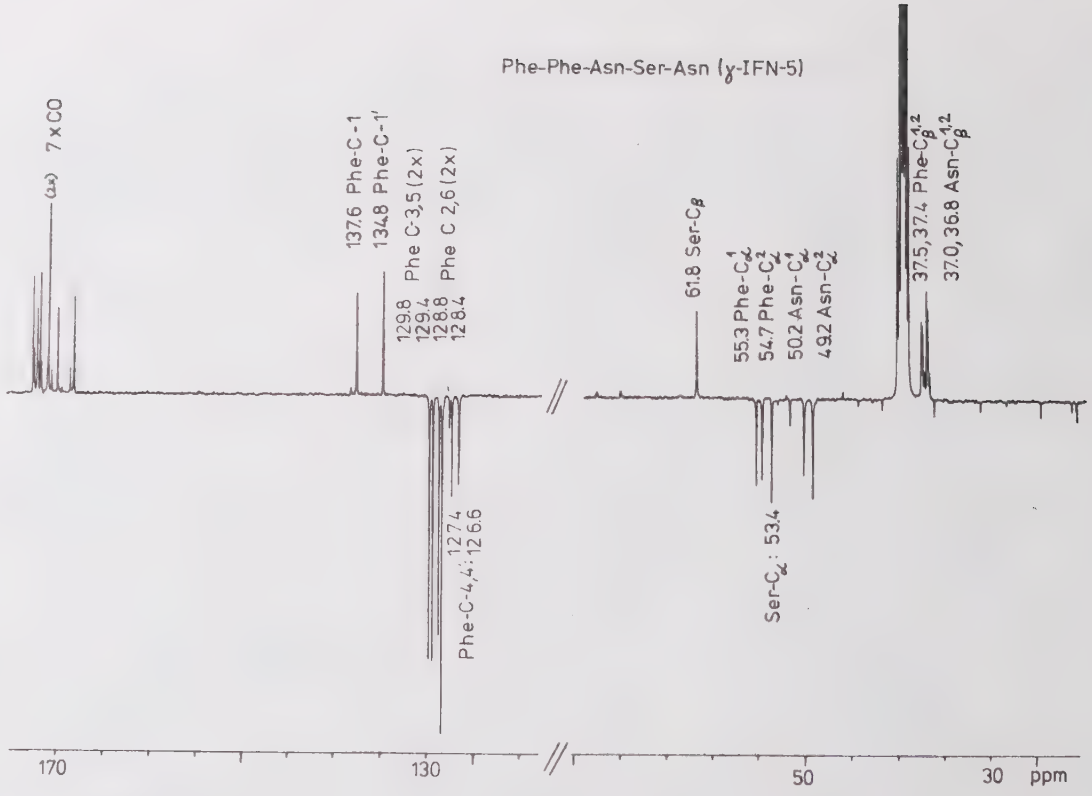


Abb. B.3: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz, 45000 scans) von γ-IFN-5 (84-88) in DMSO-d_6

3.3. ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu

Wegen der Schwerlöslichkeit von ungeschütztem γ-IFN-7 in den üblichen Lösungsmitteln, wurde ein J-moduliertes ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) von dem partiell geschützten H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu aufgenommen (Abb. B.4). Die Schutzgruppen lassen sich an Hand der tBu-(CH_3)-Signale (28.2, 28.7, und 29.0 ppm) und der quartären C-Signale bei 82.4, 79.5 und 79.2 ppm deutlich erkennen. Für Tyrosin typisch ist das Vorhandensein des nach tiefem Feld verschobenen aromatischen C-4 Peaks (154.4 ppm). Die Signale von Ser-C_α und Ile-C_α fallen bei 56.8 ppm zusammen. Genau dasselbe gilt für die Phe-C_α bei 53.8 ppm, Phe-C_β bei 37.9 ppm und für zwei CO-Signale bei 172.3 ppm. Die weitere Zuordnung der Signale erfolgt durch Vergleich mit Literaturdaten [152 a,b] und Spektren von Synthesevorstufen (Tab. B.1).

3.4. Massenspektrometrie von γ-IFN-5 und γ-IFN-7

Die Fast-Atom-Bombardement Massenspektrometrie (FAB) [153] ist eine neuere ausgezeichnete Methode um auch polare Oligopeptide durch ihr Molekülion und Fragmentierungspeaks ohne spezielle Derivatisierung nachzuweisen [154-156]. Typisch bei Oligopeptiden ist oft die Fragmentierung der CO-NH-Amidbindung. Oft wird aber auch die Spaltung der C_α-NH-Bindung beobachtet. Da die Peptidproben meist in Glycerin gelöst werden, kommt es zur Bildung polymerer $(Glycerin)_nH^+$-Ionen, welche das Untergrundrauschen im Spektrum darstellen. Das Vorhandensein von Alkaliionen führt zu Peaks wie z.B. $(M + Na)^+$. Sind basische funktionelle Gruppen enthalten, erfolgt Ionisierung durch Protonenanlagerung.

Abb. B.4: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz; J-moduliertes Spin-Echo-Experiment) von γ-IFN-7 (52-58) in $^{12}CD_3OD$.

Im FAB-Spektrum von γ-IFN-5 (Abb. B.5) findet man wie erwartet den Molekülpeak bei 628. Die Peaks bei 512, 409, 426, 312, 295 und 267 lassen auf eine am C-Terminus beginnende sukzessive Abspaltung der Aminosäuren schließen (Abb. B.5).

Der Peak bei 610 rührt von einer Dehydratisierung (M^+-18). Dasselbe Signal tritt auch im FD (Feld-Desorptions)-Massenspektrum auf (Abb. B.6). Dieses könnte wiederum ein Indiz für eine cyclische Imidbildung am Asparagin sein, wenngleich die Ergebnisse des enzymatischen Abbaus mit Carboxypeptidase A dagegen sprechen (vgl. F.2.6.).

Im FAB-Spektrum von γ-IFN-7 (Abb. B.7) zeigt das Signal bei 903 eindeutig das $[M + 2H]^+$-Molekülion. Die Fragmentierung der Aminosäuren an der CO-NH-Bindung erfolgt sowohl vom N- als auch vom C-terminalen Ende her (vgl. Fragmentierungsschema in Abb. B.7).

Tab. B.1: ^{13}C-NMR-Daten der Di- bis Heptapeptide von γ-IFN-7 (152-158)

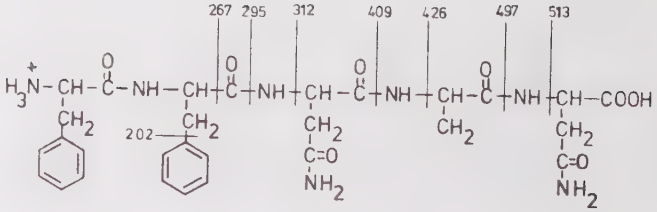
	CO-Signale	C_α	C_β	C_γ	C_δ
Boc-Ser(Bzl)-Phe-OMe ($CDCl_3$)	171.3				
Boc-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe ($CDCl_3$)	171.6 171.3 169.5				
Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe (γ-IFN 152-155) ($CDCl_3/CD_3OD$)	173.7(2x) 172.5 170.6	59.4	37.8	15.8(CH_3) 25.4(CH_2)	11.3
Z-Phe-Lys(Boc)-OtBu ($CDCl_3$)	170.8 170.5				
Z-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu	170.9 170.7 169.9				
H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu ($CDCl_3/CD_3OD$)	173.3 172.9 172.3(2x) 172.3 171.8 171.7	56.8	36.8	16.0(CH_3) 24.8(CH_2)	11.9

Val			Ser		Phe		
C_α	C_β	C_γ	C_α	C_β	C_α	C_β	$C_{arom.}$
			53.5	69.8	52.1	37.8	135.7 127.6 126.8 126.1
60.1	30.9	19.3 17.5	52.4	69.4	52.2	37.8	137.3 129.1 128.4 127.8
60.6	31.3	19.6 18.4	53.6	70.2	49.96	37.6	137.2 130.0 129.0 128.7 137.8 130.2 128.9 127.3
60.6	30.8	19.6 18.7	56.8	61.9	53.8	37.9	137.8 130.2 128.9 127.3

Fortsetzung der Tabelle B.1

	Tyr			Phe		
	C_α	C_β	$C_{arom.}$	C_α	C_β	$C_{arom.}$
Boc-Ser(Bzl)-Phe-OMe						
Boc-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe						
Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe						
Z-Phe-Lys(Boc)-OtBu				52.5	38.4	136.2 129.2 128.3 127.8
Z-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu	52.7	37.3	154.4 130.1 127.9 124.2	54.4	37.7	136.3 129.6 128.5 126.9
H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-OtBu	55.3	37.1	154.4 133.0 129.8 124.7	53.8	37.9	137.3 130.1 128.9 127.2

Lys					Schutzgruppen			
C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε				
						Bzl:	Boc:	OMe:
						135.7	155.2	54.0
						128.8	80.2	
						128.4		
						126.9		
						73.5		
						Bzl:	Boc:	OMe:
						137.7	155.8	53.5
						128.5	80.1	
						127.8	28.3	
						127.0		
						73.5		
					Z:	Bzl:		OMe:
					157.8	137.1		54.4
					138.2	129.0		
					129.0	128.5		
					128.5	127.5		
					70.2	73.9		
56.2	29.3	22.0	32.0	40.3	Z:		BOC:	tBu:
					155.8		155.8	
					136.1		79.0	82.1
					129.9		28.3	27.9
					128.4			
					126.8			
					66.9			
56.3	29.4	22.1	31.9	40.3	Z:		Boc:	tBu(2x):
					155.9		155.9	80.0
					136.0		82.0	78.4
					129.2		28.4	28.9
					128.5			27.9
					67.0			
56.3	29.8	23.3	31.9	40.7			Boc:	tBu(2x):
							157.5	79.5
							82.4	79.2
								29.0
								28.7
								28.2



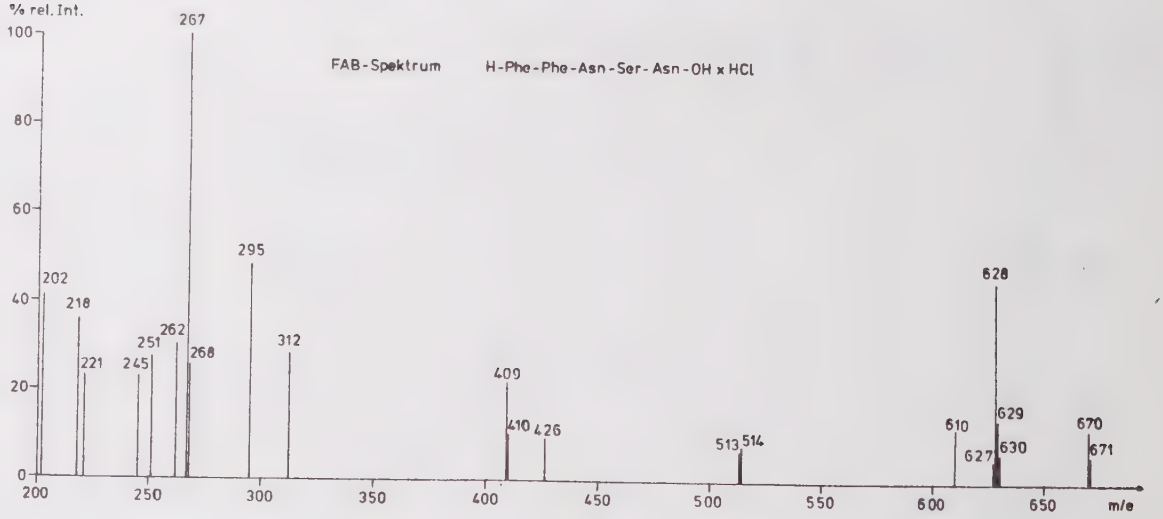


Abb. B.5: FAB-Massenspektrum von γ-IFN-5

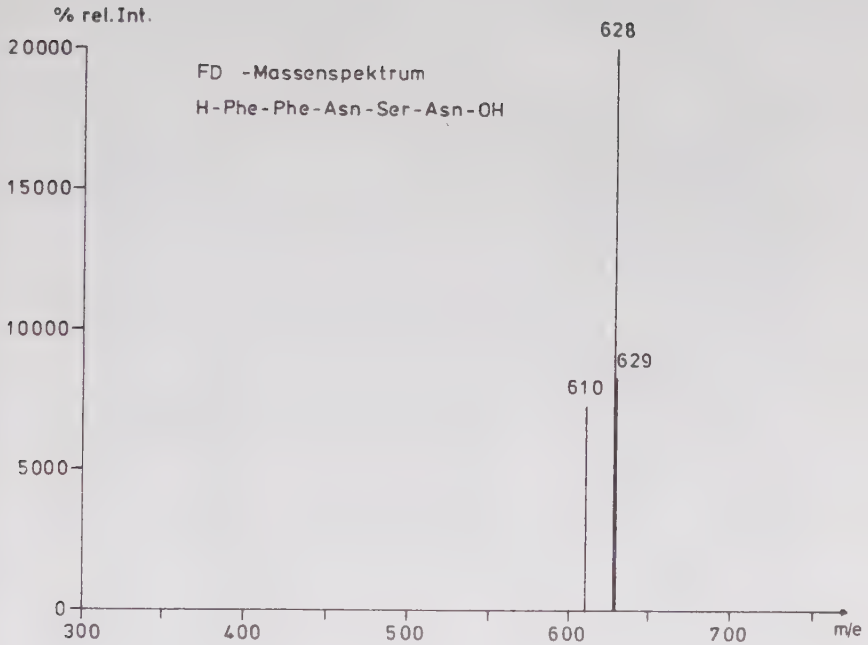


Abb. B.6: FD-Massenspektrum von γ-IFN-5 (Ionenquelle-temperatur 60°C)

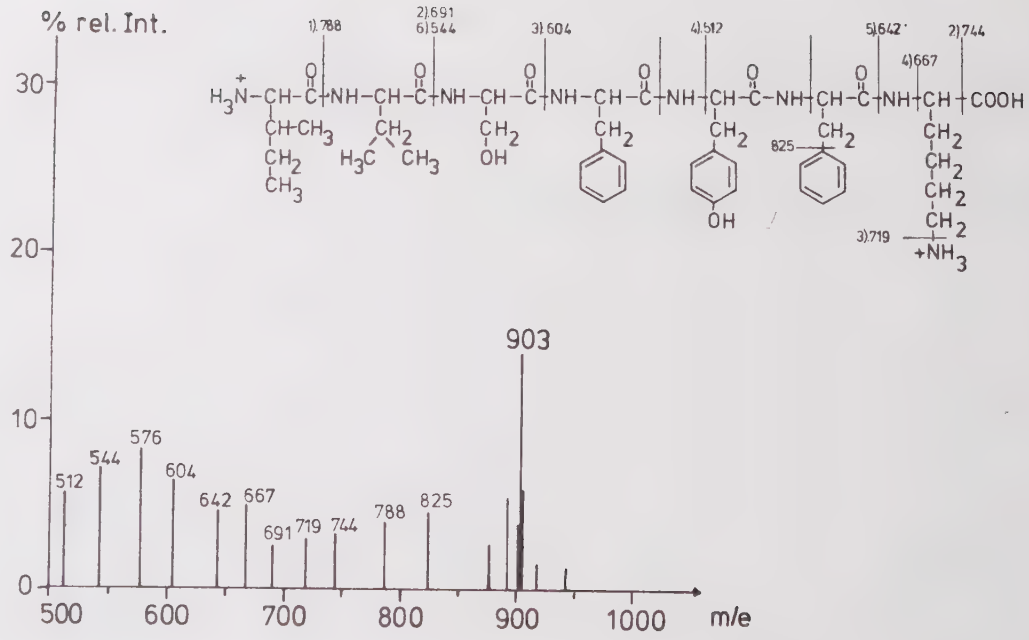


Abb. B.7: FAB-Massenspektrum von γ-IFN-7 (Ionenquellentemperatur 30°C)

4. Kupplung der Interferonpeptide an Proteine

4.1. Protein-(α-IFN-5)-Konjugat

Um Antikörper gegen das Pentapeptid α-IFN-5 zu erhalten, wurde das ungeschützte Peptid mittels wasserlöslichem Carbodiimid und Xylylendiisocyanat an HSA, BSA und KLH (Key hole Limpet Hemocyanin) gebunden. Bei der Kupplung mit wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) bekommt man vorwiegend Anknüpfung über die Arg-COOH und γ-Glu-COOH-Gruppe. Dies stellt für die Spezifität des gewonnenen Antiserums einen gewissen Nachteil dar. Ausschließlich N-terminale Kupplung erhält man bei der Verwendung von Xylylendiisocyanat. Es kann damit jedoch zur Vernetzung der Proteineinheiten kommen, was unlösliche Konjugate zur Folge hat.

Die Beladung, welche nach Dialyse mittels ASA bestimmt wurde, beträgt bei den HSA- und BSA-Konjugaten im Durchschnitt 16-18 Peptidreste pro Proteinmolekül, bei der Xylylendiisocyanatkupplung sind es etwa 32 Reste. Die Beladung am KLH wurde wegen der Schwermetalle nicht bestimmt. Die HSA und KLH-Konjugate werden zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Zum Antikörpernachweis im ELISA wird wasserlösliches BSA-Peptid-Konjugat verwendet. Würde man HSA-Konjugat verwenden bestünde die Gefahr, daß HSA-Antikörper ans beschichtete HSA-Konjugat binden, und der Assay dadurch verfälscht würde.

4.2. Protein-(γ-IFN-5)-Konjugat

Wegen der geringen Löslichkeit von γ-IFN-5 in DMF und H_2O mußte die Kupplung an HSA mittels Carbodiimid in Suspension durchgeführt werden. Man erhält eine vorwiegend C-terminale Verknüpfung. Die Peptidbeladung ist gegenüber α-IFN-5 etwas geringer.

4.3. Protein-(γ-IFN-7)-Konjugat

γ-IFN-7 wurde über den neu entwickelten Crosslinker HSc (Hydrazidosuccinyl) N-terminal an HSA gekuppelt. Hierzu wird HSc-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys entweder nach der Methode von Honzl-Rudinger mit H^+/Isoamylnitrit [157] oder nach Medzirhadzky [158] mit H^+/NO_2^- in Dimethylformamid/H_2O ins Azid N_3Sc-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys überführt. Das Azid-Peptid-Derivat reagiert unter sehr milden Bedingungen (pH 7-8; 4°C) weitgehend selektiv mit den Lys-NH_2-Gruppen vom Protein. Die Lysin-ε-NH_2-Gruppe im Heptapeptid stört in diesem Fall. Es kommt zur Bildung von Peptidoligomeren, was sich in der hohen Beladung von γ-IFN-7-Peptidresten pro Proteinmolekül widerspiegelt. Gekuppelte oliogmere Peptideinheiten ergeben zwar ein Antiserum, die erhaltenen Antikörper reagieren jedoch meist nicht mehr mit dem monomeren Peptid. Der HSc-Crosslinker scheint somit für solche Fälle, wo eine weitere Amino- bzw. Lys-ε-NH_2-Gruppe im Molekül vorhanden ist, weniger geeignet zu sein. Andererseits könnte man auch eine Ankupplung, z.B. unter ε-Boc-Schutz durchführen. Die nachfolgende Abspaltung mit Trifluoressigsäure würde mindestens bei HSA (BSA) oder Poly(Lysin)-Konjugaten nicht stören.

5. Immunologische Ergebnisse

Nach der Immunisierung von Kaninchen mit den HSA- und KLH-(α-IFN-5)-Konjugaten wurde der Antikörpertiter (Antikörperkonzentration) im Serum mittels eines ELISA-Immunoassays bestimmt (vgl. F.6). Die Titer lagen bei den HSA und KLH-Konjugaten im Bereich von 1:2000 bis 1:10000, d.h. bei diesen Antiserumverdünnungen konnte durch eine signifikante photometrische Extinktion noch ein einwandfreier Antikörpernachweis durchgeführt werden.

Erwähnenswert ist, daß bei dem HSA-Konjugat, welches mittels Xylylendiisocyanat gekuppelt wurde (N-terminale Peptidkupplung) im Gegensatz zu den mit Carbodiimid gekuppelten Konjugaten kein Antikörpertiter festgestellt wurde.
Dies ist dadurch zu erklären, daß im ELISA die Mikrotiterplatten mit einem BSA-α-IFN-5-Konjugat beschichtet wurden, bei welchem das Peptid C-terminal gekuppelt ist; d.h. an ein solches Konjugat können nur diejenigen Antikörper binden, welche gegen C-terminal gekuppelte Peptide gerichtet sind. Es ist offensichtlich, daß Antikörper, welche gegen N-terminal gekuppeltes Peptid gerichtet sind, wie im Fall von Xylylendiisocyanat, keine Bindung ergeben.

Angesichts der hohen Titerwerte von den HSA-, KLH-Konjugaten, wurde versucht in einem Inhibitionsassay (Verdrängungsassay) freies Pentapeptid nachzuweisen, wie es auch im tryptisch gespaltenen α-Interferon vorliegen müßte. Dieses Unterfangen scheiterte jedoch. Die Affinität des kleinen freien Pentapeptids zu den Peptidantikörpern ist anscheinend weitaus geringer als deren Affinität zum beschichteten BSA-Pentapeptid-Konjugat, so daß keine Inhibition der Bindung stattfinden kann. Keine Änderung der Ergebnisse bewirkten Antiseren, welche zuvor durch Aerosil- und $(NH_4)_2$-SO_4-Fällung gereinigt wurden [159a]. In einem weiteren ELISA-Test wurde untersucht, ob das Peptid als solches überhaupt in der Lage ist an beschichtetes Antiserum zu binden.

Dazu mußte α-IFN-5 mit einem Enzym, in diesem Fall mit Peroxidase (POD) markiert werden. Die Kupplung des Peptids erfolgte N-terminal an einen Zuckerrest des Enzyms, welcher zuvor in eine Aldehydgruppe übergeführt wurde [159b]. Die Aktivität des Enzyms muß trotz der Peptidkupplung erhalten bleiben. Dies ist bei Kupplungen mit Glutaraldehyd [160, 161] nicht immer der Fall, da es dort zur Vernetzung der Enzymmoleküle kommen kann.

Beschichtet man mit Antiserum, welches gegen C-terminal (Carbodiimid) gekuppeltes Peptid gerichtet ist, findet keine Bindung statt. Dagegen wird schwache Bindung beobachtet, wenn man mit Antiserum beschichtet, welches gegen N-terminal (Xylylendiisocyanat) gekuppeltes Peptid gerichtet ist. Diese Bindung erfolgt jedoch erst ab hohen Tracerkonzentration und ist zu schwach und unspezifisch um einen aussagefähigen competitiven ELISA durchführen zu können.

Obige Ergebnisse zeigen, daß kleine Peptide zwar durchaus in der Lage sind, Antiseren mit hohen Titerwerten zu bilden, die Spezifität der Antikörper aber stark davon abhängt, wie spezifisch das Peptid ans Protein gebunden wurde und wie leistungsfähig der anschließende Immunoassay zur Austestung der Antiseren ist.

Möchte man das freie Peptid in einem competitiven ELISA in geringen Konzentration nachweisen, so ist die eindeutige C- oder N-terminale Kupplung an den Träger und den Label (Enzym, Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Label) von größter Bedeutung. Je kleiner der Label ist, umso besser ist die Bindung des Tracers zum Antikörper. Radioaktive Markierung mit ^{125}Iod oder ^{3}H bringt hier gewisse Vorteile.

Eine ähnliche Problematik behandelt das anschließende Kapitel. Hier sollte mit Hilfe eines synethtischen C-terminalen Tetrapeptids des TMV-Hüllproteins versucht werden, poly- und monoclonale Antikörper gegen das TMV-Virus zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde das Tetrapeptid nicht frei im ELISA-Test eingesetzt, sondern an lösliche Träger (Polylysin, HSA) mit unterschiedlicher Beladung gekuppelt.

C. SYNTHESE EINES TETRAPEPTIDS ZUR BESTIMMUNG EINES EPITOPS AUF DEM TMV-HÜLLPROTEIN MIT HILFE EINES MONOCLONALEN ANTIKÖRPERS

Vom Hüllprotein des Tabak-Mosaik-Virus (TMV) wurden bislang acht antigene Regionen beschrieben [162]. Eine davon ist die C-terminale Region, deren Antigenität mittels polyclonalen Antikörpern gegen synthetische Tri- bis Hexapeptide bestimmt wurde [163].

Für die Bestimmung der Feinstruktur einer antigenen Region bzw. eines Epitops ist die Verwendung eines monoclonalen Antikörpers in Verbindung mit einem synthetischen Peptid bestens geeignet. Ein monoclonaler Antikörper ist spezifisch gegen eine bestimmte antigene Determinante gerichtet, außerdem ist ein synthetisches Peptid bzgl. seiner Reinheit meist besser zu charakterisieren als ein enzymatisch gespaltenes Peptid.

Monoclonale Antikörper gegen TMV wurden nach der von Dietzgen und Sander [164] beschriebenen Methode erhalten. Das synthetische Tetrapeptid wurde an verschiedene Carrier (HSA und Polylysine der Masse 37000 und 80000) in unterschiedlichen Beladungen gekuppelt. Die Träger-Tetrapeptid-Konjugate wurden im ELISA zu verschiedenen Zwecken verwendet:

a) Bestimmung der Immunreaktivität des Tetrapeptids mit polyclonalen Antikörpern

b) Bestimmung der Spezifität von monoclonalen Antikörpern mittels deren Bindungseigenschaften an das Tetrapeptid-Konjugat.

1. Synthese des Tetrapeptids und der Konjugate

Das Tetrapeptid Gly-Pro-Ala-Thr wird nach den üblichen Methoden der klassischen Synthese über die Fragmente

Boc-Pro-Ala-OMe, Z-Gly-Pro-Ala-OMe und Z-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu aufgebaut (Abb. C.1). Die Z-Schutzgruppe wird mit Pd/Aktivkohle hydrogenolytisch entfernt, die tert. Butyl-Seitenschutzgruppen mit Trifluoressigsäure innerhalb von 3 Stunden. Wegen möglicher O-Acetylierung am Threonin wurde 1.2 N HCl/Eisessig zur Abspaltung nicht verwendet [165].

Damit das Tetrapeptid von Antikörpern in einem Immunoassay gebunden werden kann, muß das Peptid spezifisch N-terminal an den Träger fixiert werden. Diese Aufgabe erfüllt der neue Crosslinker N^h-tert. Butyloxycarbonyl-hydrazido-bernsteinsäure (Boc-HSc-OH) (vgl. Kap. E.), welcher via DCC/HOBt in 1.2 fachem Überschuß an den Tetrapeptidester zu Boc-HSc-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu gekuppelt wird. Die Abspaltung mit Trifluoressigsäure (3 h) ergibt HSc-Gly-Pro-Ala-Thr (HSc-TMV-4), welches mit $H^+/-NO_2^-$ leicht ins kupplungsfähige Azid übergeführt werden kann. Das Peptid-Crosslinker-Hydrazidderivat ist die Ausgangsverbindungen für die Synthese sämtlicher Konjugate mit unterschiedlicher Peptidbeladung. Die Azidkupplung erfolgt nach der Methode von Medzihradzsky [158]. Die Reaktionszeit beträgt 48 h bei $4^{\circ}C$. Die Reinigung der Konjugate erfolgt durch intensive Dialyse gegen 0.1 N HAc und dest. Wasser. Vor Beginn der Dialyse muß unbedingt mit verd. HCl oder HBr auf pH 2 angesäuert werden. Dadurch wird evtl. überschüssiges Azid zerstört und gleichzeitig gewährleistet, daß ungekuppeltes Peptid nicht durch Ionenaustauscheffekte an der Polylysin-Matrix gebunden bleibt. Je nach Verhältnis von HSc-Peptid zu Polymer-NH_2-Gruppen wurden Konjugate unterschiedlicher Beladung erhalten. Obwohl in der Literatur hinreichend viele Beispiele für Polylysin-Peptid-Konjugate bekannt sind [166, 167], wurde mit dem HSc-Crosslinker zum ersten Mal eine nahezu quantitative Beladung von Polylysin mit einem Oligo-

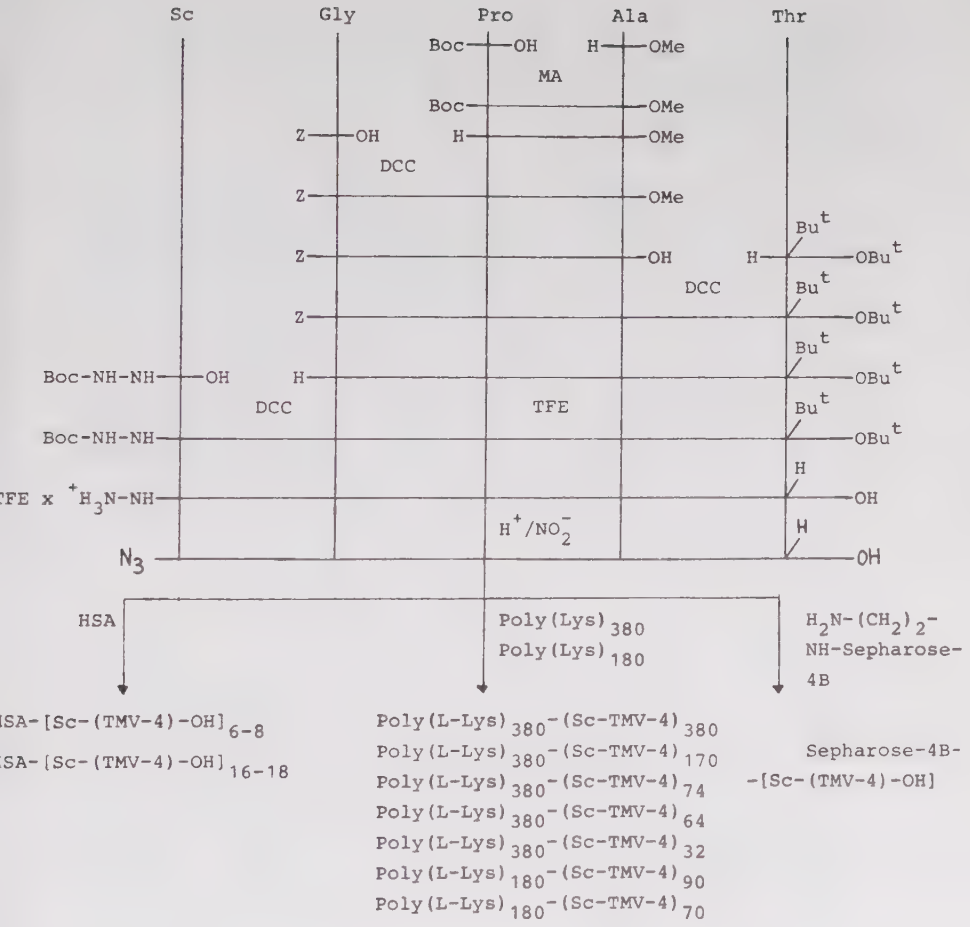


Abb. C.1: Syntheseschema des Tetrapeptids Gly-Pro-Ala-Thr(TMV-4), des Tetrapeptid-Crosslinkers (HSc-TMV-4) und der Tetrapeptid-Polymer-Konjugate.

peptid erhalten. Sämtliche synthetisierten Konjugate samt Molmasse und Beladung sind in Tabelle F.4 (experimenteller Teil) und Tabelle C.1 aufgeführt.

Die Werte in Tabelle F.4 zeigen, daß bei niedrigen Beladungen bis etwa 20 %, das eingesetzte HSc-TMV-4 nahezu quantitativ mit den Lys-NH_2-Gruppen reagiert. Um höhere Beladungen zu erhalten muß ein geringer Überschuß an HSc-Derivat eingesetzt werden.

Zuletzt wurde HSc-TMV-4 in einem 10-fachen Überschuß über das Azid an 1-Aminoethyl-2-Sepharose 4B gekuppelt. Die Kupplungsausbeute mit 10-11 µmol Peptid pro ml gequollenes Harz war nach 24 h in Dimethylformamid bei 4°C maximal.

Mit dem erhaltenen Gel können affinitätschromatographisch Antikörper gegen den TMV-Protein-C-Terminus aus polyclonalen Antiseren angereichert werden. Obige Ergebnisse zeigen, daß der neue Crosslinker HSc bestens geeignet ist, um wohldefinierte Polymer-Antigenkonjugate darzustellen. Voraussetzung ist, daß das Peptid (Antigen) keine zusätzlichen Aminogruppen (z.B. Lys-ε-NH_2) enthält.

1.1. Racemisierungstest von HSc-TMV-4

HSc-TMV-4 wurde mit 6 N HCl 24 h lang bei 110°C hydrolysiert und die D,L-Pentafluoroaminosäure-n-propylester an Chirasil-Val getrennt. Unter diesen Bedingungen erscheint die Bernsteinsäure als Bis-Propylester ebenfalls im Chromatogramm (Abb. C.2), wodurch man eine Möglichkeit hat, den Crosslinker HSc leicht gaschromatographisch nachzuweisen. Eine Racemisierung war mit höchstens 0.9 % D-Pro (Schulterpeak) nachweisbar.

Tab. C.1: Molmassen und Peptidgehalt der Poly(L-Lys)-[Sc-TMV-4] und HSA-(Sc-TMV-4)-Konjugate

Peptid-Polymer-Konjugat	Molmasse	Peptidgehalt in mg (µmol) pro mg Konjugat	
		(mg)	(µmol)
$Poly(L\text{-}Lys)_{380}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{380}$	210000	0.62	1.8
$Poly(L\text{-}Lys)_{380}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{170}$xHCl	129000	0.46	1.32
$Poly(L\text{-}Lys)_{380}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{74}$x HCl	91000	0.28	0.81
$Poly(L\text{-}Lys)_{380}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{64}$x HCl	87000	0.25	0.73
$Poly(L\text{-}Lys)_{380}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{32}$x HCl	74600	0.147	0.42
$Poly(L\text{-}Lys)_{180}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{90}$x HCl	65000	0.48	1.39
$Poly(L\text{-}Lys)_{180}$-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{70}$x HCl	57000	0.42	1.22
HSA-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{6\text{-}8}$	70000	0.04	0.114
HSA-$[Sc\text{-}TMV\text{-}4]_{16\text{-}18}$	74000	0.083	0.242

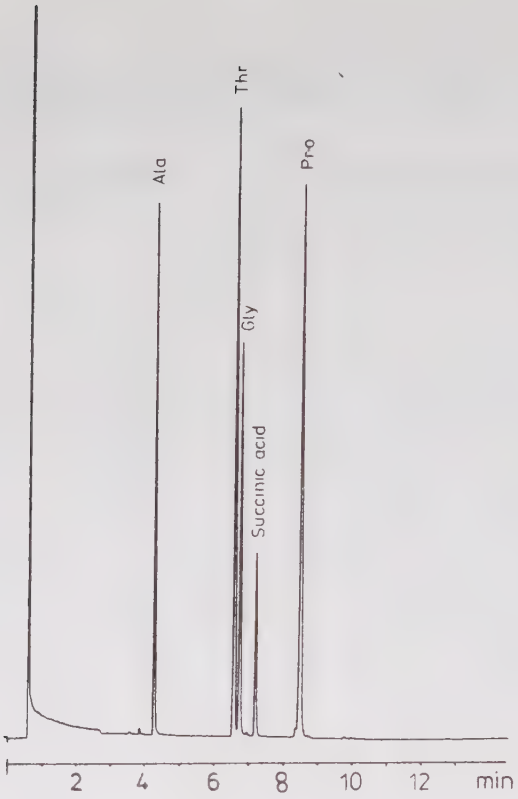


Abb. C.2: Gaschromatographische Trennung der N_{α}-Pentafluoro-aminosäure-n-propylester des Totalhydrolysats von HSc-TMV-4 an Chirasil-Val.

2. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

2.1. Tetrapeptid und Crosslinker Tetrapeptid

Alle ^{13}C-NMR-Spektren konnten auf Grund der guten Wasserlöslichkeit des freien Tetrapeptids, des Crosslinker-Tetrapeptids und der Konjugate in D_2O aufgenommen werden.

Für das Spektrum des freien Tetrapeptids Gly-Pro-Ala-Thr erfolgt die Zuordnung der Signale ohne Schwierigkeiten durch Vergleich mit Literaturdaten [152 a,b] (Abb. C.3). Nach Ankupplung des Crosslinkers HSc erscheinen im Spektrum erwartungsgemäß die beiden Carbonyl-Signale der Succinylgruppe bei 176.4 ppm und 175.2 ppm und die beiden Methylengruppen-Signale bei 30.6 ppm und 31.7 ppm. Eine deutliche Tieffeldverschiebung erfolgt bei dem Gly-CO-Signal von 168.1 nach 171.7 ppm, sowie beim Gly-C_α von 43.0 ppm nach 44.2 ppm (Abb. C.4). Am Threonin ist bei beiden Verbindungen keine O-Acetylierung zu erkennen.

2.2. Tetrapeptid-Polylysin-Konjugate

Interessant sind die Spektren der Poly-L-Lysin-Peptidkonjugate. Die Abbildung C.5 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum eines vollständig mit Tetrapeptid geladenen Polylysinderivats, mit ca. 380 Lysinmonomeren.
Zum Vergleich wurde ein Spektrum eines zu 45 % beladenen Polylysins aufgenommen, welches zusätzlich noch ungekuppeltes Succinyl-Tetrapeptid (Sc-TMV-4) enthält. Von den Lys-CH_2-Signalen zeigt das Lys-C_α bei 57.5 ppm eine starke Signalverbreitung, wogegen Lys-C_ε und Lys-C_δ als scharfe Signale erscheinen. Es ist inzwischen bekannt, daß verbreiterte Lys-CH_2-Signale von einer relativ starren α-helicalen Polylysinstruktur herrühren. Hingegen sind scharfe Lys-CH_2-Signale als Zeichen größerer Beweglichkeit

Tab. C.2: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale von Tetrapeptid, Tetrapeptidderivaten und den Polylysin-Peptidkonjugaten

	TMV-4xHCl (D_2O)	HSc-TMV-4xHCl (D_2O)	Poly-$(Lys)_{380}$-$(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{170}$+ Sc-TMV-4 ($D_2O$)	Poly-$(Lys)_{380}$-$(HSc\text{-}TMV\text{-}4)_{380}$ (D_2O)	Boc-HSc-TMV-4 ($CDCl_3$)
Ala-C_β	19.0	18.8	19.1; 19.2	19.1	17.7
Thr-C_γ	21.3	21.2	21.7; 21.9	21.6	20.5
Lys-C_γ			25.1 (breit)	25.2 (breit)	
Pro-C_γ	26.8	26.8	24.8	25.6	24.6
Lys-C_δ			27.1	27.1	
Sc-$CH_2{}^2$		30.6	29.1	30.6	29.5
Sc-$CH_2{}^1$		31.7	30.6 (frei)	33.3	31.0
			33.8 (geb.)		
Pro-C_β	32.1	31.9	32.1	32.1	29.4
Lys-C_β			33.8; 33.6	33.6	
Lys-C_ε			41.9	41.8	
			41.7 (frei)		
Lys-C_α	43.0	44.2	44.4	44.4	42.0
Pro-C_δ	49.5	49.5	49.7	49.7	46.4
Ala-C_α	52.3	52.1	52.3; 52.1	52.3	48.9
Lys-C_α			56.2 (breit)	56.1 (breit)	
Pro-C_α	60.4	60.3	61.6	62.7	58.3

Fortsetzung der Tabelle C.2

	TMV-4xHCl (D_2O)	HSc-TMV-4xHCl (D_2O)	Poly-(Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{170}$ Sc-TMV-4 (D_2O)	Poly-(Lys)$_{380}$-(HSc-TMV-4)$_{380}$ (D_2O)	Boc-HSc-TMV-4 ($CDCl_3$)
Thr-C_α	62.8	62.8	63.0; 62.7	61.7 (breit)	60.0
Thr-C_β	69.9	69.6	69.7; 70.7	69.0	67.0
C=O:					
Lys-CO			179.0; 177.5	177.6; 177.5	
Sc-CO[1]		176.4	177.0; 176.8	177.0; 176.8	172.6
Sc-CO[2]		175.2	176.5; 176.2	176.5(2); 171.8	172.4
Gly-CO	175.9	175.8	176.1; 176.0		172.1
Pro-CO	177.8	177.6	173.3; 172.0		171.2
Ala-CO	176.2	176.9	171.9		169.4
Thr-CO	168.1	171.7			168.3
Schutzgruppen:					
				Boc(CO)	155.6
				Boc(q)	81.0
				Boc(CH_3)	28.0
				OBu^t(q)	81.7
				OBu^t(CH_3)	28.5
				tBu^t(q)	78.4
				tBu^t(CH_3)	27.9

der Lysin-Methylenseitengruppen typisch für eine Polylysin-Knäuelstruktur [168,169]. Die C-Atome des gekuppelten Tetrapeptids zeigen ausschließlich scharfe Signale, d.h. sie sind frei beweglich (Abb. C.6).

Betrachtet man das Spektrum des entsprechenden Konjugats mit 45 % Peptidbeladung, erscheint das Lys-C_α, genauso wie das Lys-C_γ-Atom als verbreitertes Signal.
Das Lys-C_β-Atom zeigt eine Aufspaltung in ein breites und ein scharfes Signal bei 33.3 und 33.6 ppm, wobei das erstere von peptidbeladenen Lysinresten stammt, der scharfe Peak hingegen von unbeladenen Lysinresten. Im Gegensatz zum Lys-C_ε-Atom, welches in zwei scharfe Signale bei 44.1 und 44.4 ppm aufgespalten ist, erscheint Lys-C_δ als ein Peak bei 27.1 ppm.
Es scheint, als würde durch die Kupplung des Peptids an Polylysin eine Stabilisierung der teilweisen α-helikalen Konformation eintreten. Auch bei vollständiger Beladung des Polylysinmoleküls ist eine Polylysin-Helix vorhanden.

Die ppm-Werte von gebundenem und freien Tetrapeptid unterscheiden sich deutlich bei den Thr-C_α-,C_β-,C_γ und den Ala-C_α,C_β-Atomen. Beim Glycin und Prolin ist keine bzw. eine nur sehr geringe Aufspaltung der Signale zu sehen. Das Signal des N-terminalen Succinyl-CH_2^1-Atoms erscheint im freien Sc-TMV-4 bei 30.6 ppm, im gekuppelten Polylysin-Konjugat dagegen bei 33.3 ppm (Abb. C.6). Das ^{13}C-NMR-spektrum stellt in diesem Fall eine zusätzliche Möglichkeit dar, um an Hand der Intensitäten des aufgespaltenen Lys-C_ε-Signals eine grobe Beladungsbestimmung durchzuführen.

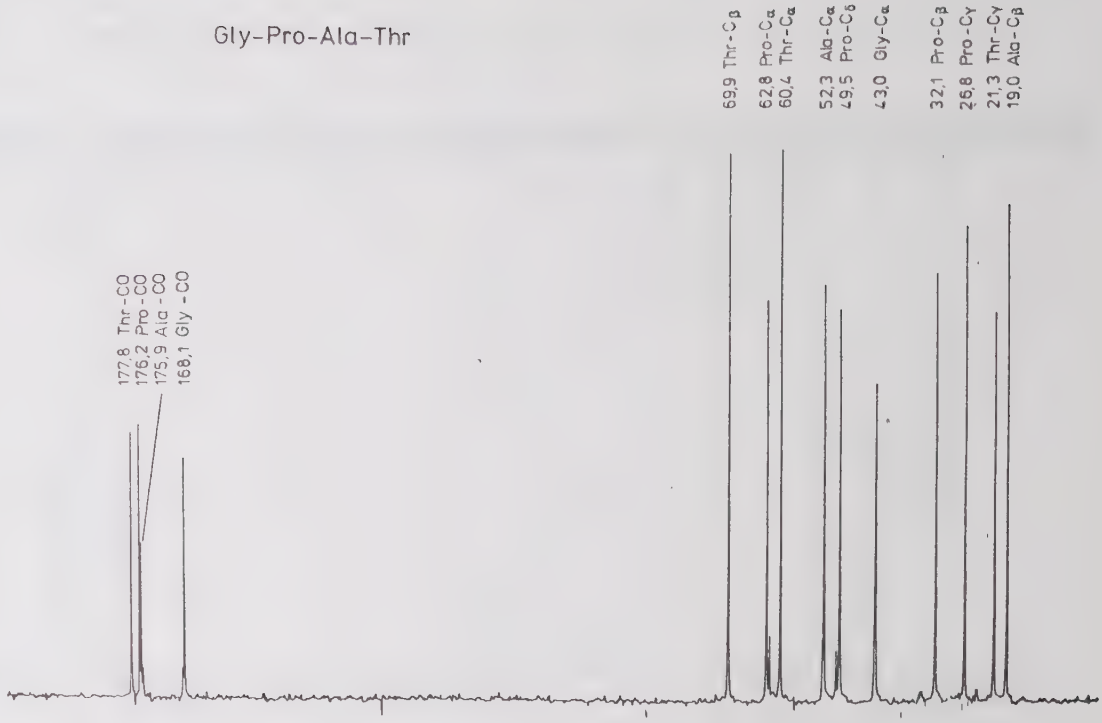


Abb. C.3: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz, D_2O) von Gly-Pro-Ala-Thr (TMV-4) (die kleineren Signale rühren wahrscheinlich von geringfügigen Verunreinigungen her).

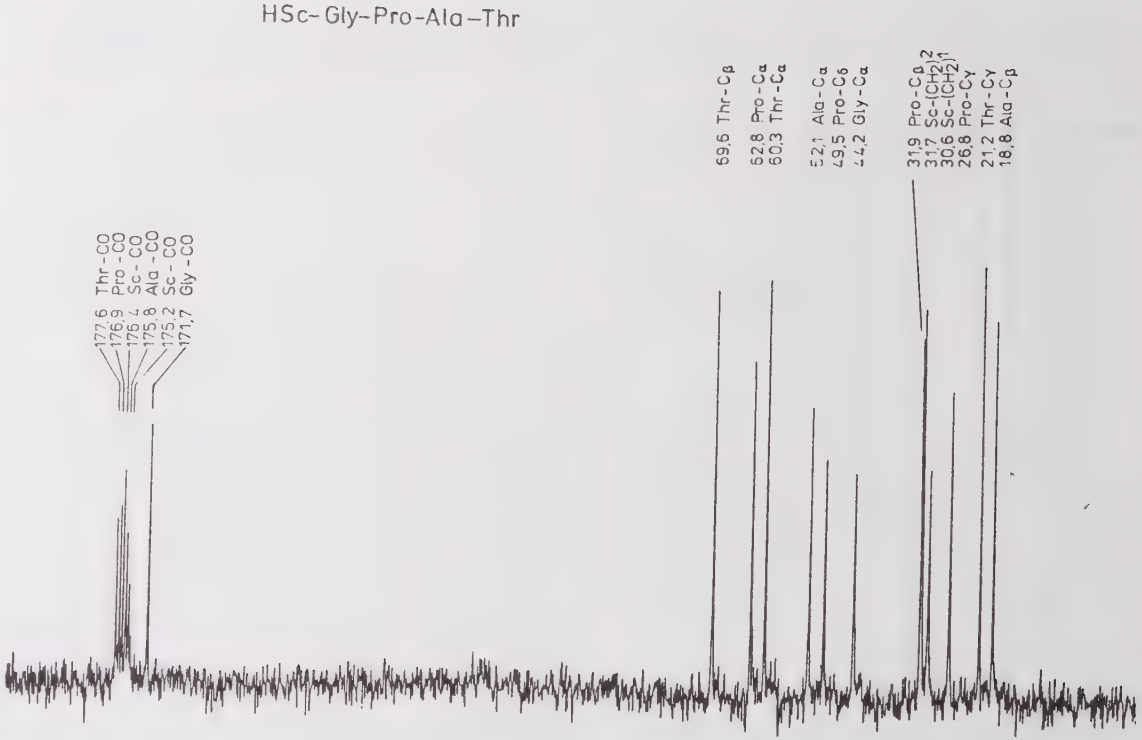


Abb. C.4: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz, D_2O) von Hydrazido-succinyl-Gly-Pro-Ala-Thr (HSc-TMV-4)

Abb. C.5: ^{13}C-NMR-Spektrum eines vollbeladenen Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$-Konjugats (100.62 MHz; D_2O; c = 8 mg/ml)

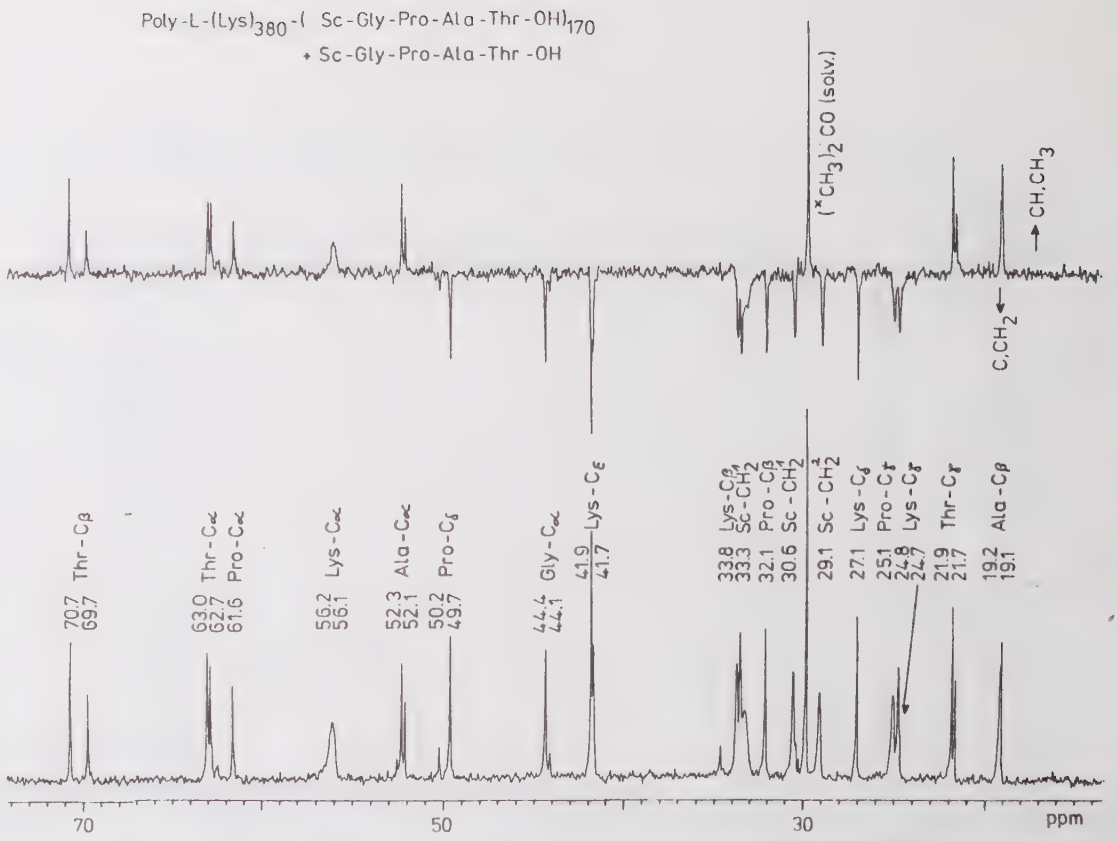


Abb. C.6: J-moduliertes ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz; D_2O) von Poly(l-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$, welches freies Sc-TMV-4-Peptid enthält.

3. Circulardichroismus

Die Circulardichroismus(CD)-Spektren der unterschiedlich hoch beladenen Polylysin-Tetrapeptidkonjugate, Poly(L-Lys)$_{380,180}$-(Sc-TMV-4) bei pH 2 und pH 11.5 zeigen erwartungsgemäß eine pH-abhängige Konformation. Bei unbeladenen Polylysinen findet bekanntlich zwischen pH 9 und 11 der Übergang von der Knäuelstruktur (random coil) zur α-Helix statt [170]. Die α-Helix-Struktur kann durch Zusatz von Methanol oder Ethanol zur wässrigen Polylysinlösung stabilisiert werden.

Der Cotton-Effekt bei 207 nm zeigt mit steigender Peptidbeladung eine starke Zunahme (Abb. C.7) und eine Blauverschiebung. Dies rührt vorwiegend vom Tetrapeptid her, dessen Cotton-Effekt im CD-Spektrum leicht nach Blau verschoben erscheint (Abb. C.8). Selbst beim vollständig beladenen Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$ sind α-helikale Konformationsanteile vorhanden, welche beim Ansäueren des Konjugats auf pH 2 nicht verloren gehen (Abb. C.9).

Dies ist ein deutliches Indiz für die volle Beladung der Polylysinmatrix mit Peptid, da bei teilweise beladenem Konjugat die α-Helix beim Ansäuern vollständig in die Knäuelform übergeht.

Die spektralen Änderungen im CD-Spektrum sind bei den HSA-Sc-TMV-4-Konjugaten weitaus weniger signifikant, vielmehr zeigt sich eine weitgehende Retention der Konformation von HSA bei der Beladung mit Tetrapeptid.

Obwohl das CD-Spektrum des freien Tetrapeptids gewisse "β-Turn"-Anteile erkennen läßt (Abb. C.8) ist letztlich keine eindeutige Konformationsbestimmung möglich. Das Vorhandensein von Prolin läßt jedoch sicher auf einen "Turn" schließen.

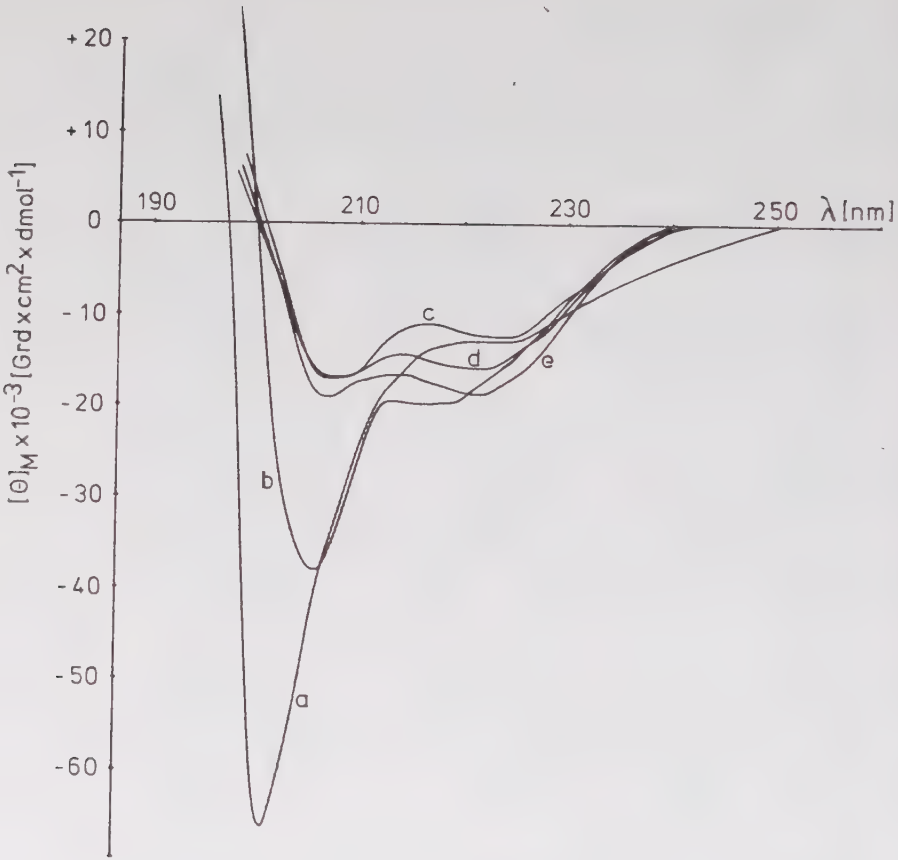


Abb. C.7: CD-Spektren von Poly(L-Lysin)-Konjugaten mit unterschiedlicher Beladung an Tetrapeptid (c = 1 mg/ml; Wasser pH 11.5); Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$ (a), Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{170}$ (b), Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{64}$ (c), Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{32}$ (d), und freies Poly(L-Lys) (e).

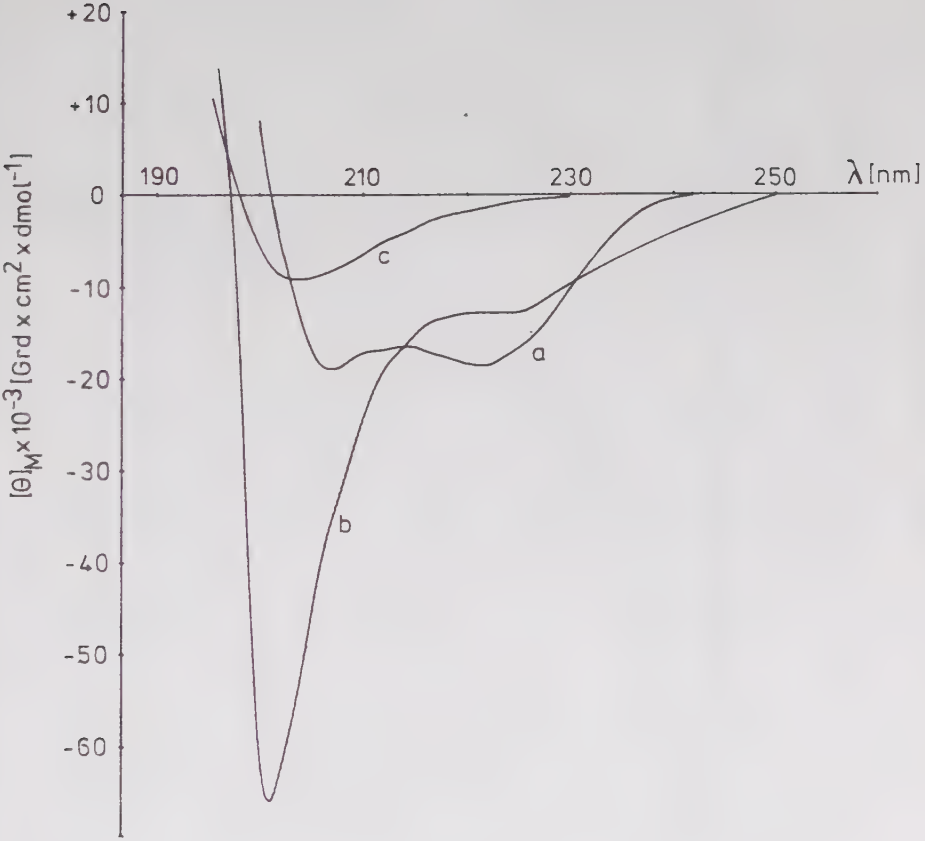


Abb. C.8: CD-Spektren (Wasser pH 11.5, c ~ 1 mg/ml) von unsubstituiertem Poly(L-Lys)$_{380}$ (a), maximal substituiertem Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$ (b) und freiem Tetrapeptid TMV-4 (c).

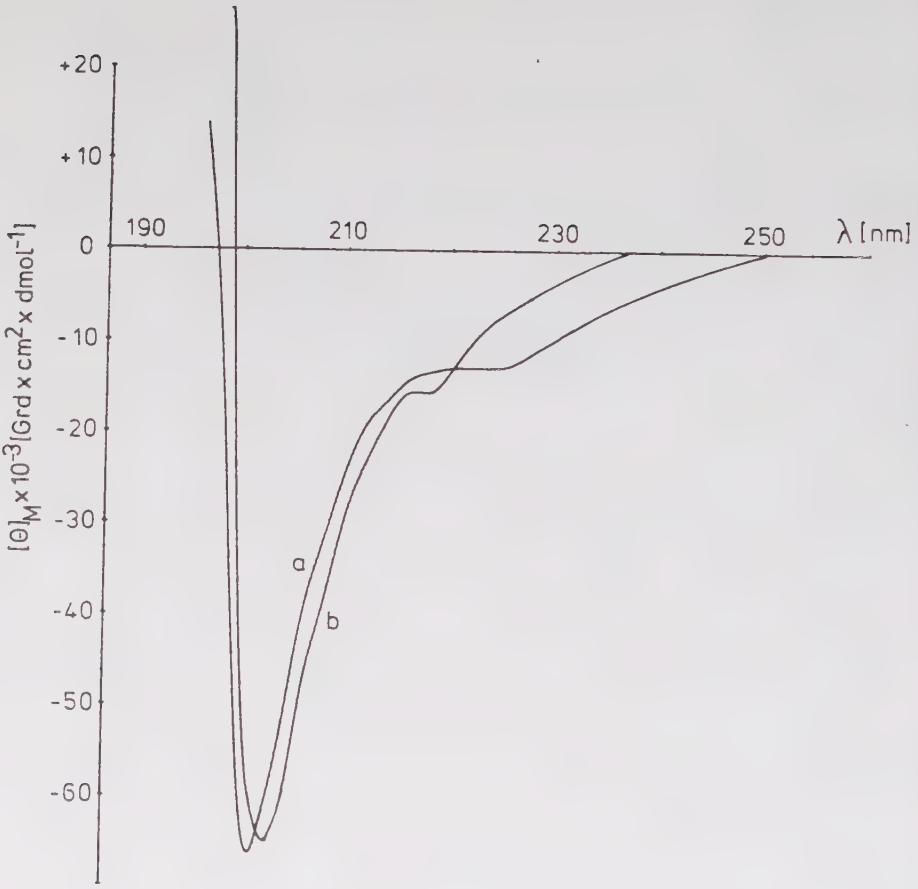


Abb. C.9: CD-Spektren von Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{380}$ in Wasser pH 11.5 (a) und pH 2 (b); (c ~ 1 mg/ml)

3.1. Konformationsanalyse der TMV-Hüllproteine

Weitere Hinweise über die Konformation des C-Terminus können anhand einer Sekundärstrukturanalyse geschaffen werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms nach der Vorhersage-Methode von Chou und Fasman (1978) [56] wurden die Polypeptidketten der drei Virusstämme TMV-vulgare, TMV-dahlemense und TMV-Holmes'-Ribgrass auf ihre Sekundärstruktur hin untersucht.
In den Konformationsdiagrammen wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von α-Helices, β-Turns und Knäuelstruktur gegen die fortlaufende Polypeptidsequenz aufgetragen (Abb. C.10). Unterhalb dem Konformationsdiagramm ist eine Hydrophilieskala abgebildet. Die Hydrophilie wurde nach der Methode von Hopp und Woods [53] ebenfalls mit einem Computerprogramm bestimmt. Da bei dieser Berechnungsmethode immer die Hydrophilie der fünf folgenden Aminosäuren berücksichtigt wird, hört die Skala bereits bei Position 153 auf. Meistens findet man antigene Determinanten, wenn ein Wahrscheinlichkeitsmaximum für einen β-Turn mit einem Hydrophiliemaximum zusammenfällt.

Die C-terminalen Regionen der TMV-Hüllproteine besitzen alle eine α-Helix, welcher sich ein β-Turn anschließt. Dieser gemeinsame β-Turn ist schließlich auch die Ursache dafür, daß ein monoclonaler Antikörper, welcher gegen den C-Terminus von TMV vulgare gerichtet ist, mit den anderen TMV-Stämmen kreuzreagiert (vgl. Kap. 4, Abb. C.14).
Weitere antigene Regionen findet sich z.B. im Bereich der Aminosäuren 60 und 68.

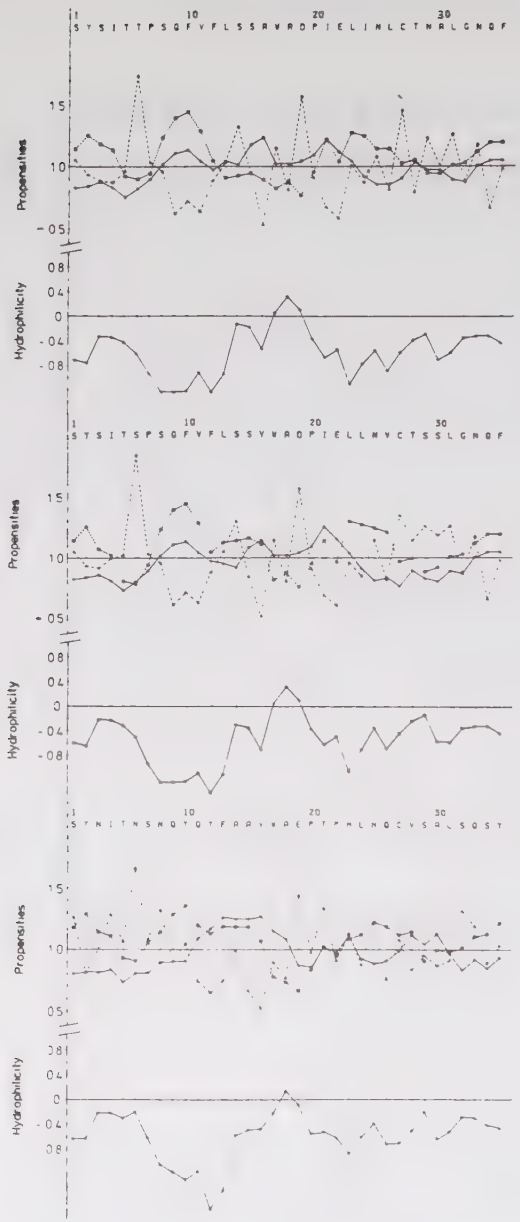
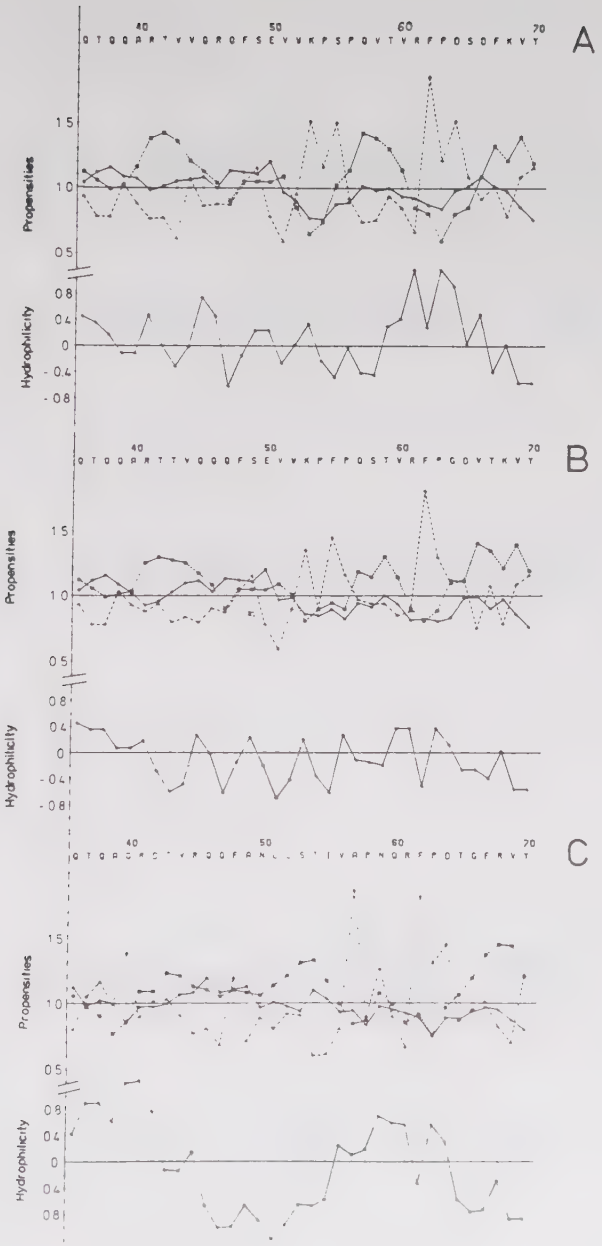
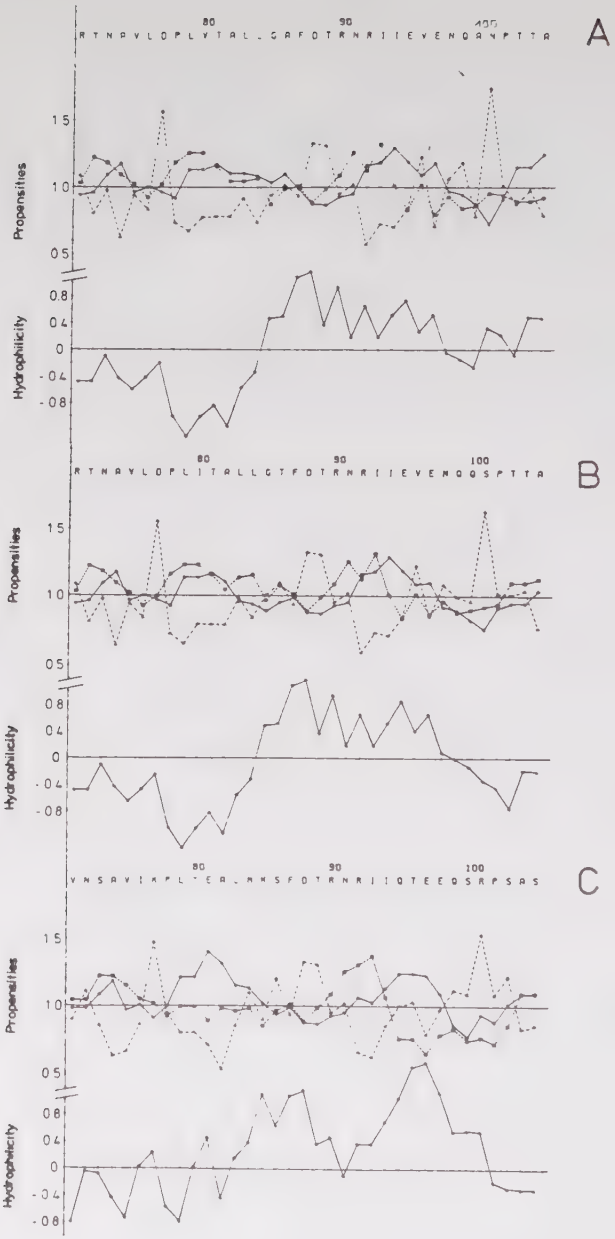
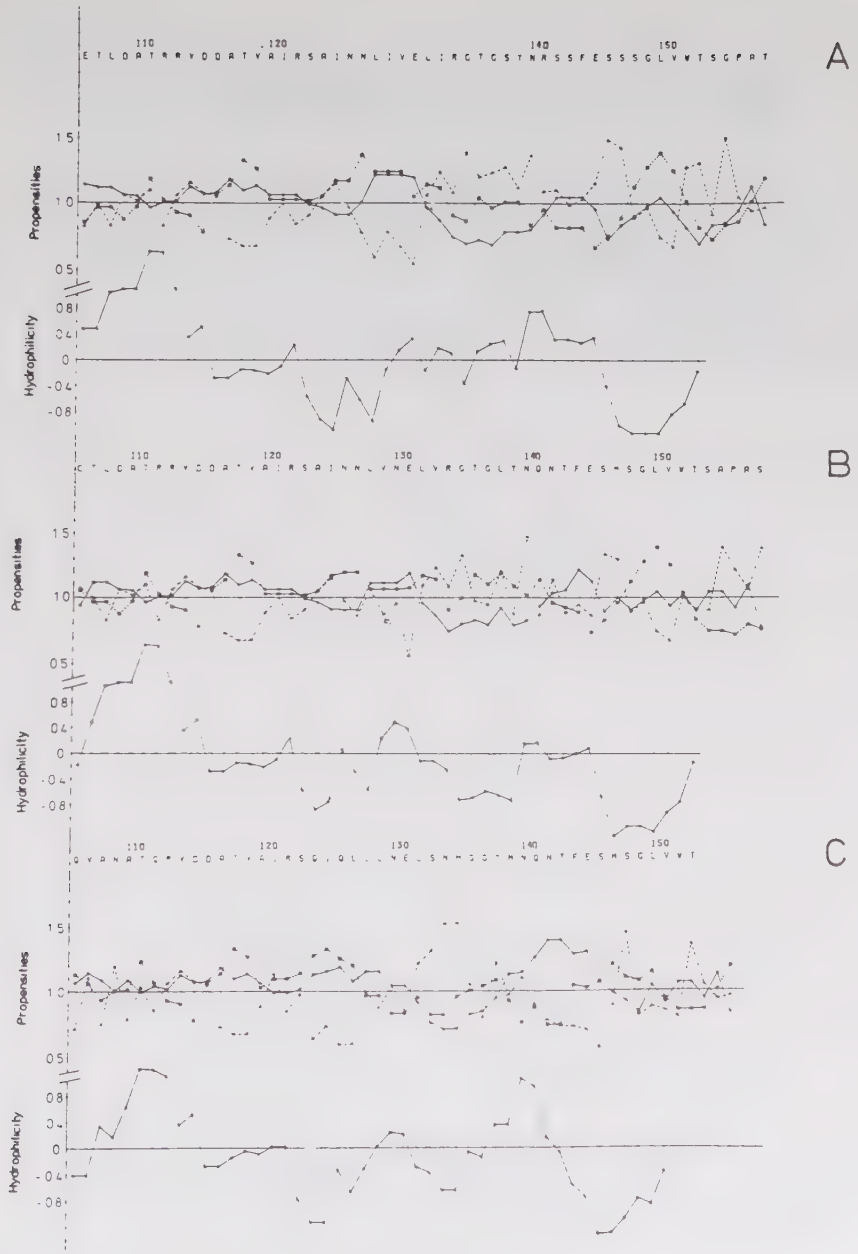


Abb. C.10: Konformations- und Hydrophiliediagramme für die Stämme TMV - vulgare (A), TMV-dahlmense (B) und TMV-Holmes'Ribgrass (C). Es bedeuten: α-Helix


A
B
C
Propensities
Hydrophilicity
40
50
60
70
1.5
1.0
0.5
0.8
0.4
0
-0.4
-0.8


A
B
C
Propensities
Hydrophilicity
80
90
100
1.5
1.0
0.5
0.8
0.4
0
-0.4
-0.8


A
B
C
Propensities
Hydrophilicity

4. Immunreaktivität des synthetischen Tetrapeptids TMV-4 mit poly- und monoclonalen Antikörpern

Zur Bestimmung der Immunreaktivität des freien Tetrapeptids und der Tetrapeptid-Konjugate mit mono- bzw. polyclonalen Antikörpern wurde der indirekte ELISA-Immunoassay (Abb. C.11) verwendet. Getestet wurden monoclonale Antikörper gegen den C-Terminus des Stammes TMV-vulgare und polyclonale Antikörper gegen das gesamte Virus von TMV-vulgare [172,173].

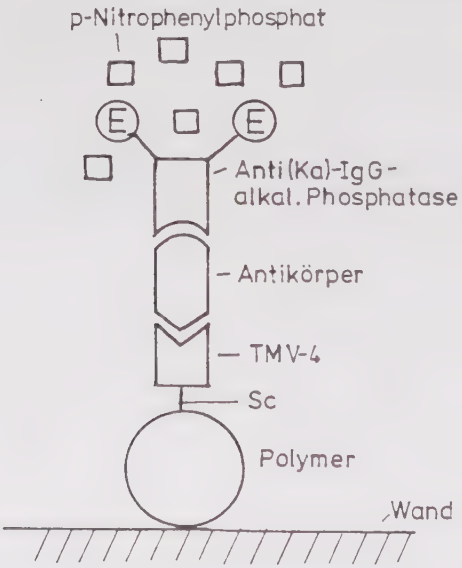


Abb. C.11: Indirekter ELISA zum Nachweis virusspezifischer Antikörper

Als Antigene werden Poly(L-Lys)$_{380,180}$- bzw. HSA-Tetrapeptid (TMV-4)-Konjugate mit unterschiedlichen Peptidbeladungen verwendet.

Wie sich herausgestellt hat ist eine Beschichtung der Mikrotiterplatten mit freiem Tetrapeptid nicht sehr erfolgreich. Wahrscheinlich sind die Beschichtungskonzentrationen zu gering oder das kleine Tetrapeptid ist an der starren Oberfläche der Mikrotiterplatten für den Antikörper nicht mehr zugänglich. Es gibt auch die Möglichkeit das Peptid mittels Glutaraldehyd kovalent an die Platten zu binden [171] oder einen Inhibitionstest mit freiem Peptid durchzuführen (vgl. Kap. F. 6.2.) oder das Peptid wie erwähnt an einen polymeren Träger zu binden, und das erhaltene Konjugat zu beschichten.

Wie aus den Ergebnissen in Tab. C.3 ersichtlich ist, binden polyclonale Antikörper gegen natives TMV an das synthetische Peptid TMV-4. Wird mit trägergebundenem Tetrapeptid z.B. Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{74}$ beschichtet, ist der Nachweis für Tetrapeptid um den Faktor 10^5 empfindlicher als wenn man mit freiem Tetrapeptid beschichten würde. Beschichtet man mit dem Crosslinker-Tetrapeptid (Sc-TMV-4) wird bereits eine 6-7-fache Steigerung der Nachweisempfindlichkeit beobachtet. Dies beruht möglicherweise auf der besseren Zugänglichkeit des Antikörpers zum Peptid infolge des Spacereffekts.

Eine höhere Peptidbeladung der HSA-Konjugate hat eine wesentliche Steigerung der Immunreaktivität bzw. der Nachweisempfindlichkeit für TMV-4 zur Folge. Nochmals um etwa den Faktor 4 besser als beim HSA-(Sc-TMV)$_{16-18}$-Konjugat, liegt die Peptidnachweisgrenze beim viermal stärker beladenen Poly(L-Lys)-(Sc-TMV)$_{74}$-Konjugat.

Bei vollständiger Peptidbeladung des Polylysins, wird nicht, wie ebenfalls erwartet werden könnte, die Nachweisempfindlichkeit für TMV-4 verbessert, im Gegenteil es treten geringfügig kleinere Extinktionswerte auf. Dies dürfte auf eine größere sterische Hinderung der gebundenen

Tab. C.3: Nachweisgrenze der Tetrapeptid-Konjugate im indirekten ELISA [172].

Die Nachweisgrenze von Tetrapeptid wurde durch die Immunreaktivität mit polyclonalenen Antikörpern gegen TMV-vulgare bestimmt. Die Messung erfolgte bei 405 nm nach 60 min. (Schaf-anti-ka-JgG mit alkal. Phosphatase markiert, Substrat: p-Nitrophenylphosphat, Glycin-Puffer)

Tetrapeptid-Konjugate[a]	Extinktion[b] 405 nm	Konjugat-Konzentration (g/ml)	Tetrapeptid-Konzentration g/ml	mol/Loch
RMV-4	0.064[b]	-	1.0×10^{-4}	5.8×10^{-8}
Sc-TMV-4	0.413	-	8.0×10^{-5}	4.6×10^{-8}
HSA: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{6-8}$	0.104	1.0×10^{-8}	4.9×10^{-10}	2.8×10^{-13}
HSA: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{16-18}$	0.353	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-10}	5.8×10^{-14}
$Poly(Lys)_{380}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{74}$	0.343	1.0×10^{-10}	2.8×10^{-11}	1.6×10^{-14}
$Poly(Lys)_{180}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{90}$	0.204	1.0×10^{-10}	4.8×10^{-11}	2.8×10^{-14}

a) Bei Beschichtung mit reinem $Poly(L\text{-}Lys)_{380,180}$, HSA und Threonin (C-terminalen Aminosäure vom TMV-Protein), konnte in Konzentrationen bis zu 10^{-4} g/ml keine Immunreaktion festgestellt werden.

b) Messwerte sind Durchschnittswerte von 8 Messungen

Antikörpermoleküle zurückzuführen sein (Tab. C.4). Die Nachweisgrenze von 5.8 fmol an gekuppeltem Tetrapeptid wurde am besten mit dem Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{64}$-Konjugat erreicht.
Mit den immunreaktivsten Konjugaten Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{64}$ und HSA-(Sc-TMV-4)$_{16-18}$ wurde in einem ELISA-Test ein monoclonaler Antikörper (MCA 95) gefunden, welcher sowohl mit dem Tetrapeptid als auch mit dem nativen Virus und dem monomeren TMV-Hüllprotein reagierte (Abb. C.13). Die Reaktivität des monoclonalen Antikörpers mit dem Virus und dem Hüllprotein ist höher als mit dem Polylysinkonjugat. Der Antikörper hat wohl zur Bindung an die natürliche längere antigene Determinante, den C-Terminus des Hüllproteins mehr Platz zur Verfügung als beim synthetischen Tetrapeptid, welches mit einem Spacer an den Carrier gebunden ist (Abb. C.12).

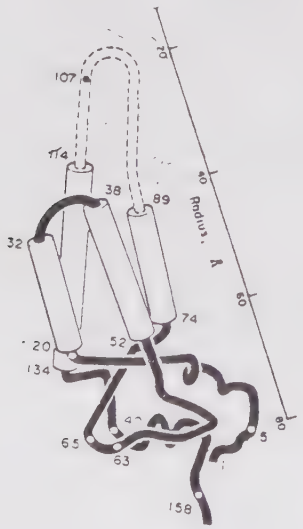


Abb. C.12: Schematische Darstellung der Faltung des TMV-Hüllproteins [174]

Tab. C.4: Immunreaktivität der Polylysin-Tetrapeptidkonjugate in einem indirekten ELISA [172]

Die Immunreaktivität (Extinktion bei 405 nm) wurde mit polyclonalen Antikörpern (vom Kaninchen) bestimmt, welche gegen natives TMV-vulgare gerichtet sind. Die Messung erfolgt nach 60 min Substratinkubation in einem Diethanolamin-Substratpuffer.

Tetrapeptid-Konjugate[a]	Konzentration von gekuppeltem Tetrapeptid (fmol/Loch)			
	580	58	5.8	0.58
$Poly(Lys)_{380}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{380}$	2.000[b]	1.154	0.210	0.000
$Poly(Lys)_{380}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{170}$	2.000	1.440	0.186	0.000
$Poly(Lys)_{380}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{64}$	2.000	2.000	0.275	0.000
$Poly(Lys)_{380}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{32}$	2.000	1.423	0.119	0.000
$Poly(Lys)_{180}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{90}$	2.000	1.119	0.121	0.000
$Poly(Lys)_{180}$: $(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{70}$	2.000	1.179	0.132	0.000

a) Keine Immunreaktivität wurde bei Beschichtung mit ungekuppeltem $Poly(L\text{-}Lys)_{380,180}$ erhalten.

b) Jeder Messwert stellt den Durchschnitt von 8 Einzelmessungen dar.

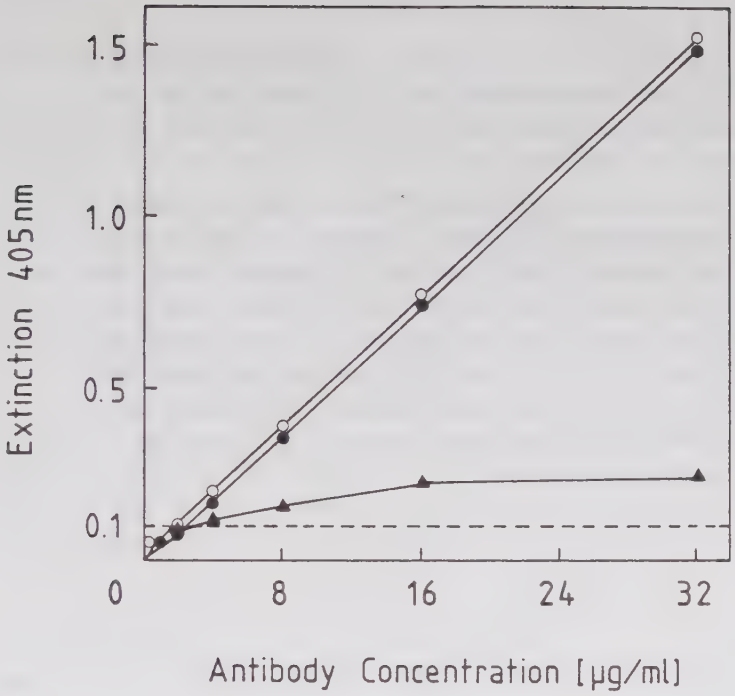


Abb. C.13: Reaktivität des monoclonalen Antikörpers MCA 95 mit nativem TMV vulgare (o — o), TMV-Hüllproteinmonomeren (● — ●) und dem Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{64}$-Konjugat (▲ — ▲). Die Mikrotiterplatten wurden mit 10 µg/ml TMV, 10 µg/ml TMV-Hüllproteinmonomer und 0.1 µg/ml des Poly(L-Lys)$_{380}$-(Sc-TMV-4)$_{64}$ beschichtet [172].

Die Ergebnisse zeigen, daß es mit einem synthetischen Tetrapeptid, welches an Träger gebunden ist, möglich ist poly- und monoclonale Antikörper gegen den C-Terminus des TMV-Hüllproteins zu bestimmen. Das Peptid, über einen Spacer an den löslichen Träger (Polylysin, HSA) gebunden, kann somit die natürliche antigene Determinante des Protein-

C-Terminus ersetzen. Man kann sich vorstellen, daß das C-terminale Ende des Proteins wie ein Hapten an den Rest des Moleküls gebunden ist (Abb. C.12), und dadurch vergleichsweise frei drehbar ist.

Wider Erwarten kreuzreagiert der monoclonale Antikörper (MCA 95) mit allen drei Stämmen von TMV. Der Grund dafür ist, daß wie erwähnt, bei allen drei C-Termini wegen des Prolins ein charakteristischer β-Turn vorliegt und die ausgetauschten Aminosäuren bezüglich ihrer Polarität ähnlich sind (Abb. C.14). Zum Schluß ist noch zu erwähnen, daß durch Verwendung der Polylysin-Peptidkonjugate ein neues, sehr empfindliches ELISA-System zum Antikörpernachweis geschaffen wurde.

Stamm	
TMV vulgare	-Gly-Leu-Val-Trp-Thr-Ser- Gly-Pro-Ala-Thr
TMV dahlemense	-Gly-Leu-Val-Trp-Thr-Ser- Ala-Pro-Ala-Ser
TMV Holmes' Ribgrass	-Gly-Leu-Pro-Trp-Thr-Ser- Ala-Pro-Ala-Thr

Abb. C.14: C-terminale Aminosäuresequenz der TMV-Stämme [175].

Herrn Dr. R.G. Dietzgen und Frau Prof. Dr. E. Sander, Institut für Mikrobiologie II der Universität Tübingen, danke ich für die Durchführung der Immunoassays sowie für viele wertvolle Diskussionen.

Nachtrag zu Kapitel C.4

Nach Fertigstellung der Arbeit wurde noch ein weiteres wichtiges immunologisches Ergebnis erhalten:

Die Infektiosität von TMV-Viren auf Tabak-Blättern kann durch Inkubation mit mono- bzw. polyclonalen Antiserum aufgehoben werden. Es wurde versucht diese Neutralisation der Infektiosität durch Zugabe von freiem Tetrapeptid TMV-4 aufzuheben. Dieser Versuch mißlang. Es fand keine Inhibition der Bindung zwischen TMV-Antikörper und TMV-Virus bei Peptidzugabe statt. Hingegen konnte eine Inhibition bei der Zugabe des Poly(L-Lys)$_{380}$-(TMV-4)$_{64}$-Konjugats beobachtet werden, was bedeuten würde, daß das polymergebundene Tetrapeptid eine größere Affinität zum TMV-Antikörper besitzt als das freie Tetrapeptid TMV-4.

D. IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN MITOCHONDRIALEN PROTEINS AUS DER URF-1-DNA-SEQUENZ VON NEUROSPORA CRASSA MITTELS PEPTIDANTIKÖRPERN

1. Einleitung

Alle Organismen mit Zellatmung besitzen Mitochondrien als intercellulares Kompartiment. Neben den wichtigen Enzymproteinen der Atmungskette beherbergen die Mitochondrien auch Enzyme der oxidativen Phosphorylierung, des Fettabbaus und des Tricarbonsäurecyclus. Ein gut untersuchtes Mitochondrien-System besitzt der Pilz Neurospora crassa [176]. Ein Großteil dieser Enzymproteine befindet sich in der inneren und äußeren Mitochondrienmembran dieses Mikroorganismus. Interessanterweise stammen ca. 90 % der mitochondrialen Innenmembranproteine, sämtliche Außenmembranproteine und die löslichen Matrixproteine genetisch vom Cytosal ab, d.h. die Zell-DNA und nicht die mitochondriale DNA (mt DNA) codiert für diese Proteine. Lediglich 10 % der Mitochondrien-Proteine, wie z.B. Cytochromoxidase stammen von einer mitochondrialen DNA. Die Mitochondrien-DNA von N. crassa ist bereits bis zu etwa 80 % sequenziert, ein Teil davon (60 kbp) wurde von G. Burger und S. Werner sequenziert [179]. Auf dem Stück dieser mt-DNA befindet sich ein bisher noch nicht identifizierter Leserahmen (URF-1, unidentified reading frame), d.h. man kennt noch kein Protein, welches durch diese URF-Sequenz codiert ist.

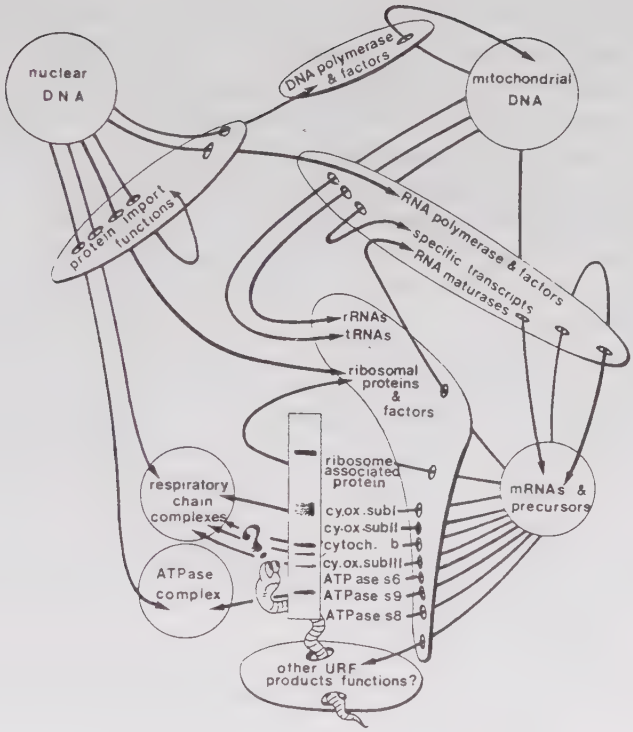


Abb. D.1: Darstellung von den Wechselwirkungen der wichtigsten genetischen Funktionen, welche an der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind. Das Elektrophorese-Chromatogramm zeigt die bisher bekannten mitochondrialen Translationsprodukte [179]

Die URF-1-Sequenz enthält ein Intron (Schleife), welche nicht exprimiert, d.h. abgelesen wird (Abb. D.2).

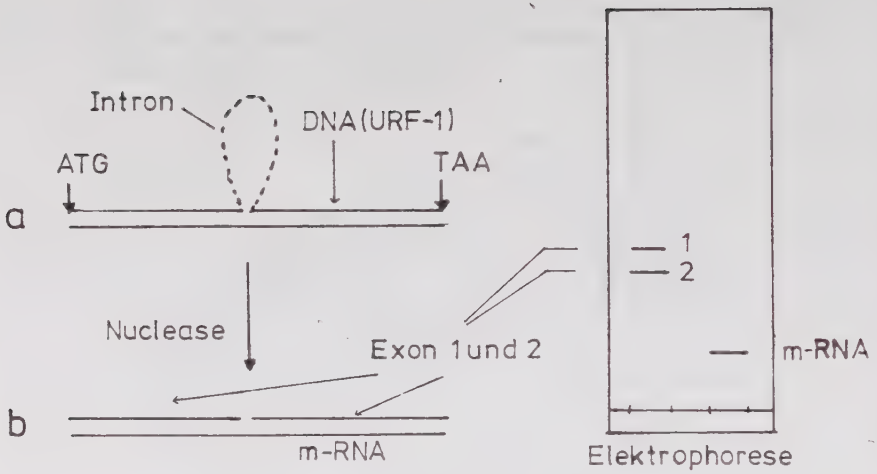


Abb. D.2: Hybridisierung einer DNA (URF-1) mit einer entsprechenden m-RNA:
a) mit Intron,
b) nach Herausspleißen des Introns.

Trennt man die gesamte mitochondriale m-RNA elektrophoretisch auf, so findet sich eine m-RNA, welche mit der intronhaltigen URF-Sequenz hybridisiert werden kann. Das Intron kann mittels einer Nuclease enzymatisch herausgespalten werden, wobei man zwei DNA-Abschnitte (Exon 1 und 2) erhält. Trennt man diese elektrophoretisch in SDS (sodium dodecylsulfate) auf, so entsprechen die Molmassen der beiden Exon-Sequenzen zusammen derjeniger der m-RNA. Für die URF-Sequenz ohne Intron ergibt sich dadurch ein durchgehender Leserahmen, welcher mit ATG (Met) beginnt und mit TAA (Stopcodon für Proteinkette) aufhört.

durchgeführt (Abb. D.3)*.

Auf Grund von zu 35 % identischen Aminosäuren findet man für die Sekundärstruktur und Hydrophilie beider Proteine in weiten Bereichen eine große Übereinstimmung. Von der Sequenz des URF-1 wurden zwei Peptide ausgewählt und synthetisiert. Die erste Sequenz ist das Nonapeptid NC-9, welches den Bereich von Position 60-68 abdeckt. Nach der Computeranalyse sind für diese Region Anteile an α-Helix und Knäuelstruktur zu erwarten, wogegen das Auftreten eines Turns als unwahrscheinlich gilt (Abb. D.3). Der Anteil an homologen Aminosäuren in der Sequenz beträgt 44 %. Mit dieser Sequenz sollte überprüft werden, ob gegen ein Peptid für welches keine ausgeprägte Sekundärstruktur bzw. Hydrophilie vorausgesagt wird, proteinreaktive Antikörper gebildet werden.

Nach etwas anderen Kriterien wurde die Auswahl für das Tetradecapeptid NC-14 im Bereich 200-213 getroffen. Für diese Sequenz wird u.a. wegen Prolin ein β-Turn vorausgesagt, welchem eine α-Helix folgt (Abb. D.3). Gleichzeitig stellt dieser Sequenzabschnitt die einzige polare Region der Polypeptidkette in der näheren Umgebung dar und hat noch zusätzlich 85 % der Aminosäuren mit dem Humanprotein gemeinsam. Ein weiterer Vorteil der NC-14 Sequenz ist, daß sie beiden Exonregionen (1 und 2) des URF-1 angehört. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit proteinreaktive Antikörper zu bekommen.

Mit Antikörpern gegen die Peptide NC-9 und NC-14 sollte es nicht nur möglich sein ein neues Protein in den Mito-

---

* Ich danke Carl Christoph Jung für diese Berechnungen mittels seines Programmes HYCON 5 auf dem CBM 8032.

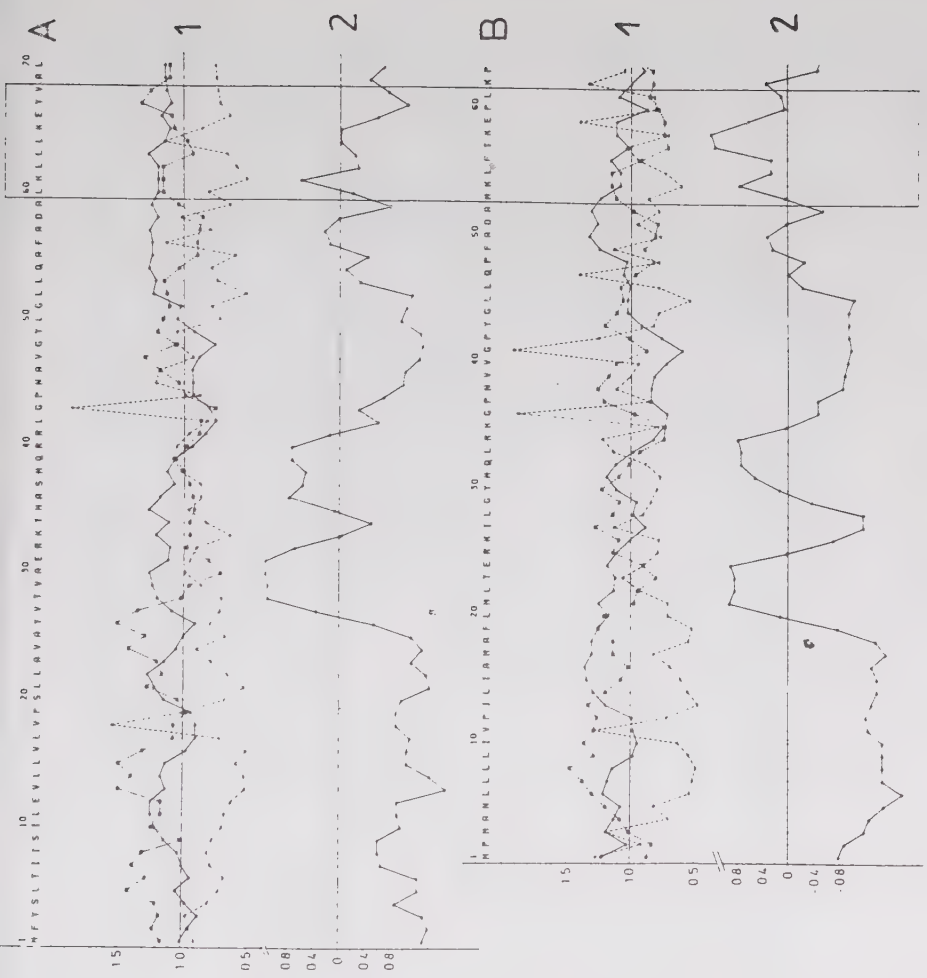
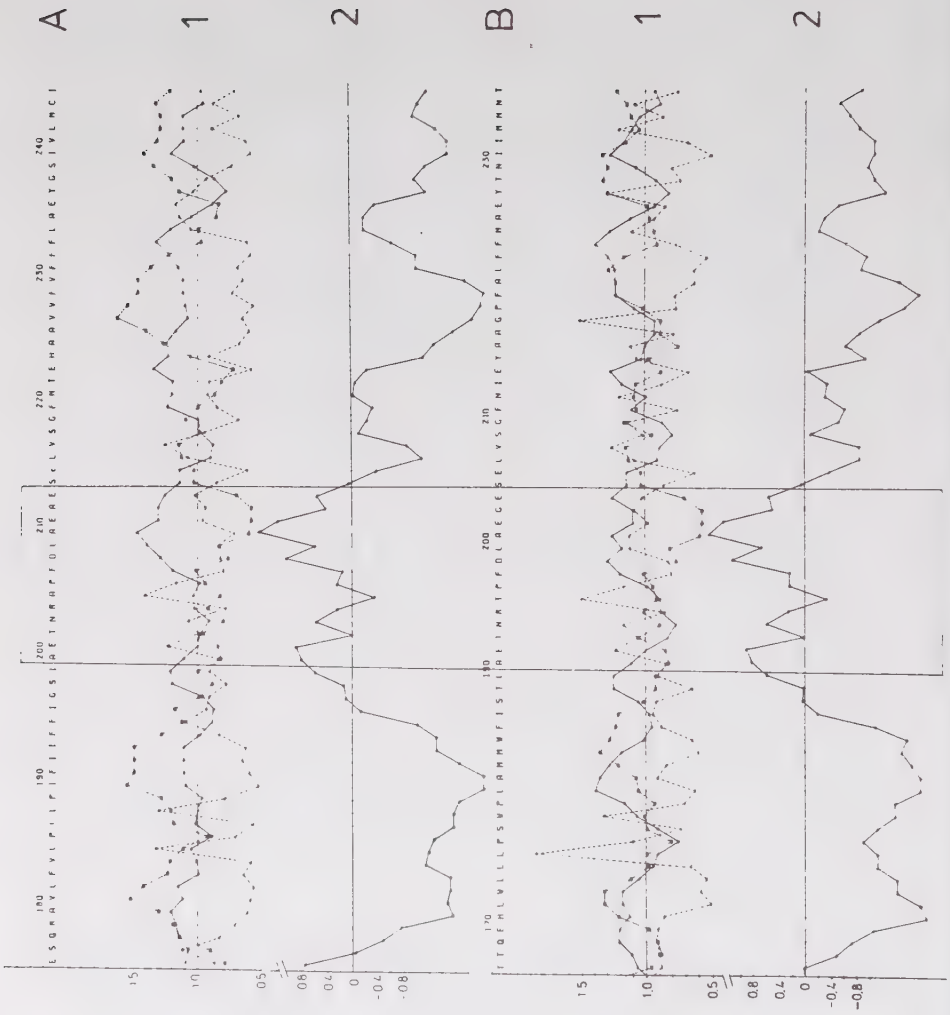


Abb. D.3: Sekundärstrukturanalyse eines Teils der URF-1-Region eines Genabschnitts von Neurospora crassa (A) und der entsprechenden Gensequenz beim Menschen (B). Die oberen Kurven (1) zeigen die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer α-Helix (—), β-Turn (---) und Knäuelstruktur (···). In der unteren Kurve (2) ist der Verlauf der Hydrophilie entlang der Polypeptidkette abgebildet. Umrandeter Bereich stellt die Sequenz NC-9 dar.



Forsetzung Abb. D.3: Umrandete Proteinregion stellt die Sequenz von NC-14 dar.

chondrien von Neurospora crassa zu identifizieren, sondern auch das homologe beim Menschen.

3. Synthese der Peptide und Konjugate

3.1. Synthese von NC-9 und BSA-NC-9-Konjugaten

Die beiden Sequenzen aus der URF-1-Sequenz von Neurospora crassa NC-9 und NC-14 wurden nach der Festphasenmethode durch Verwendung der N_α-Fmoc-Schutzgruppe mit tert.-Butyl-Seitenschutz aufgebaut. Wie bei früheren Synthesen wurde 1 % vernetztes PS-DVB Harz mit dem säurelabilen p-Alkoxybenzylalkohol-Anker verwendet. Die Ausbeuten lagen nach jedem Kupplungsschritt über 99.5 %, so daß nach Abspaltung vom Harz mittels Trifluoressigsäure (2.5 h) das rohe N_α-Fmoc-geschützte Nonapeptid in hoher Ausbeute (82 %) und guter Reinheit (95 %) erhalten wurde. Eine lipophile Verunreinigung ließ sich durch Gelfiltration an LH-20 (Chloroform:Methanol = 1:1) problemlos entfernen. Das freie Peptid NC-9 wird nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin/Dimethylformamid und Reinigung an Sephadex G-15 (0.1 m Essigsäure) als dünnschichtchromatographisch einheitliches Peptid erhalten.

N_α-Fmoc-NC-9 wurde mit wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) in Dimethylformamid/Wasser (1:1) an Rinderserumalbumin gekuppelt. Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe an dem gekuppelten Peptid mit Piperidin/Dimethylformamid wird ein Konjugat erhalten, welches 20-23 Nonapeptidreste enthält.

Da die ε-Aminogruppen der beiden Lysinreste ungeschützt blieben, kann es bei der Carbodiimidkupplung zu Nebenreaktionen kommen. Um dies zu vermeiden, wurde versucht vor

der Kupplung die Lys-ε-Aminogruppen mit der Fmoc-Gruppe zu schützen. Durch Umsetzen von N_α-Fmoc-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu-Tyr-Val (N_α-Fmoc-NC-9) mit einem 10-fachen Überschuß an Fmoc-Chlorid erhält man zu ca. 70-80 % das Tri-Fmoc-geschützte Peptid, der Rest setzt sich aus dem einfach- bzw. zweifach geschützten Nonapeptid zusammen. Kuppelt man das 80 % reine Tri-Fmoc-NC-9 mit Carbodiimid an BSA, erhält man nach Abspaltung der Fmoc-Gruppen mit Piperidin ein Konjugat, welches lediglich 3-4 Peptidreste pro Albuminmolekül enthält.
Die Ursache für die niedere Beladung können sterische Gründe sein oder die Tatsache, daß wegen der Schwerlöslichkeit des geschützten Nonapeptids in Dimethylformamid/Wasser die Kupplung in Suspension erfolgen mußte.

3.2. Synthese von NC-14 und des HSA-NC-14-Konjugats

Das Tetradecapeptid NC-14 wurde nach der gleichen Strategie aufgebaut wie NC-9. Im Gegensatz zur Synthese von α-IFN-5, bei dem Arginin durch Protonierung geschützt wurde, kam bei NC-9 die neue N^G-Mtr (4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl)-Gruppe zur Verwendung. Die Mtr-Gruppe ist stabil gegenüber Piperidin und kann mit Trifluoressigsäure-Thioanisol (5 %) bei Raumtemperatur innerhalb von 3 h abgespalten werden [195]. Im Vergleich zu den anderen Fmoc-Aminosäuren ist die Kupplung von N_α-Fmoc-Arg(Mtr)-OH allerdings erst nach 18-20 h quantitativ.

Das vom Träger abgespaltene Peptid zeigt im Dünnschichtchromatogramm nach der Abspaltung vom Träger (Trifluoressigsäure/5 % Thioanisol, 3 h) zwei Doppelpeaks. Der lipophilere Doppelspot, welcher wahrscheinlich von einer unvollständigen Mtr-Schutzgruppenabspaltung herrührt, läßt sich durch Reinigung des Rohpeptids an Sephadex G-15 (0.1 m Eisessig) entfernen.

4. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

4.1. ^{13}C-NMR-Spektrum von Fmoc-NC-9

Wegen der besseren Löslichkeit von N_α-Fmoc-NC-9 gegenüber dem freiem Nonapeptid wurde ein ^{13}C-NMR-Spektrum des geschützten Peptids in $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (1:1) aufgenommen (Abb. D. 4, 5, 6). Die Fmoc-Gruppe erkennt man an der charakteristischen Aufspaltung der Aromatensignale in Ringposition 4a und 4 b (140.8 und 140.9) [206]. Ebenfalls leicht verschoben sind die ppm-Werte der C-Atome 1 und 8 (124.4 und 124.5 ppm) (Abb. D.5).
Typisch für Tyrosin ist das nach tiefem Feld verschobene aromatische C-4-Atom bei 155.1 ppm. Gut aufgelöst erscheinen die Signale von den vier Leu-C_α-Kohlenstoffatomen (53.9; 54.1; 54.3; 54.4 ppm). Diese lassen eindeutig das Vorhandensein der vier Leucinreste erkennen, genauso wie die gut aufgelösten Peaks von Leu-C_β, Leu-C_γ und Leu-$C_{\delta 1,2}$. Ähnliches gilt für Lysin, wo jeweils die zwei Signale für Lys-C_α, C_β, C_γ und C_δ auf die richtige Struktur hindeuten. Bei höherem Feld erscheinen die Signale für Val-$C_{\gamma 1}$ und Val-$_{\gamma 2}$ (17.7 und 18.4 ppm) (Tab. D.1). Erwartungsgemäß befinden sich bei tiefem Feld neun Carbonyl-Signale mit 1 Doppelsignal entsprechend den zehn Aminosäure-CO-Gruppen (Abb. D.6).

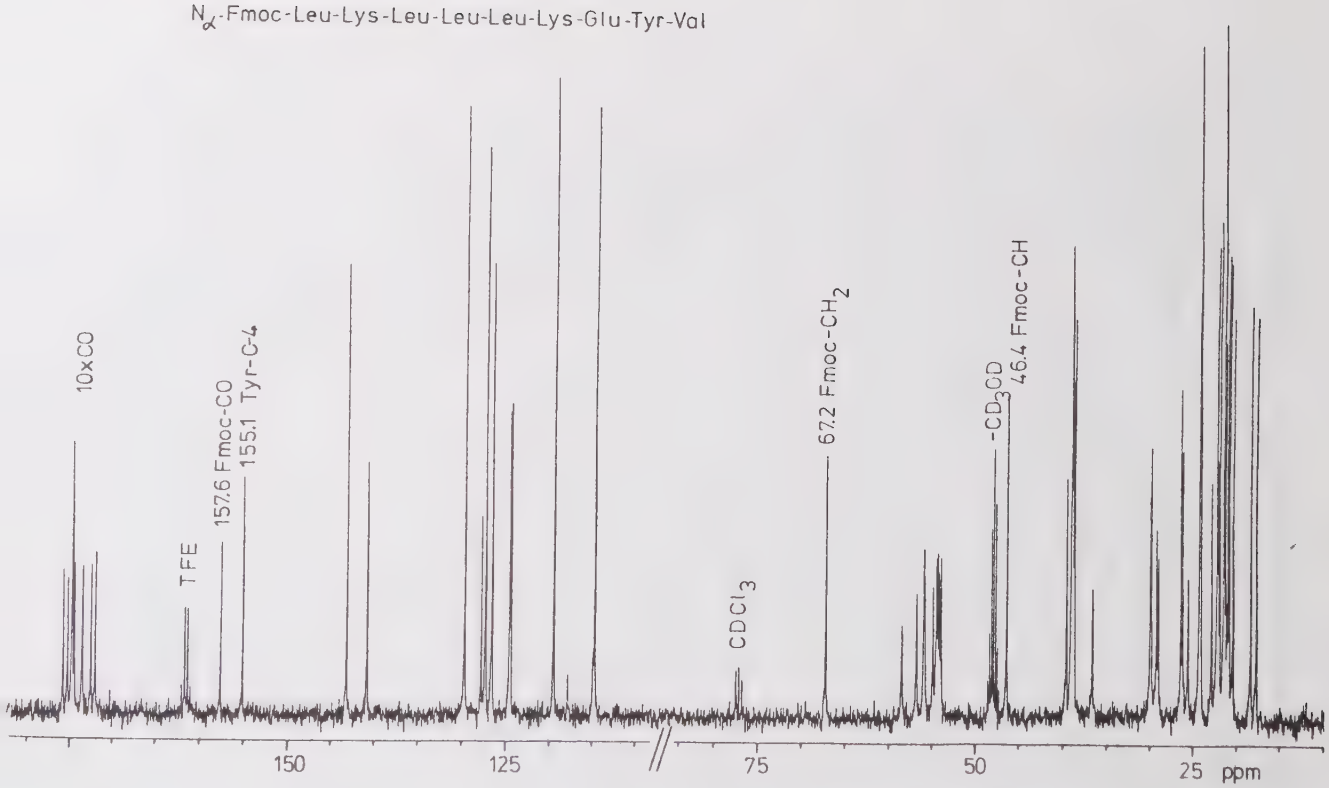


Abb. D.4: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz, $^{12}CD_3OD$, $^{12}CDCl_3$) von Fmoc-NC-9 x 2 TFE

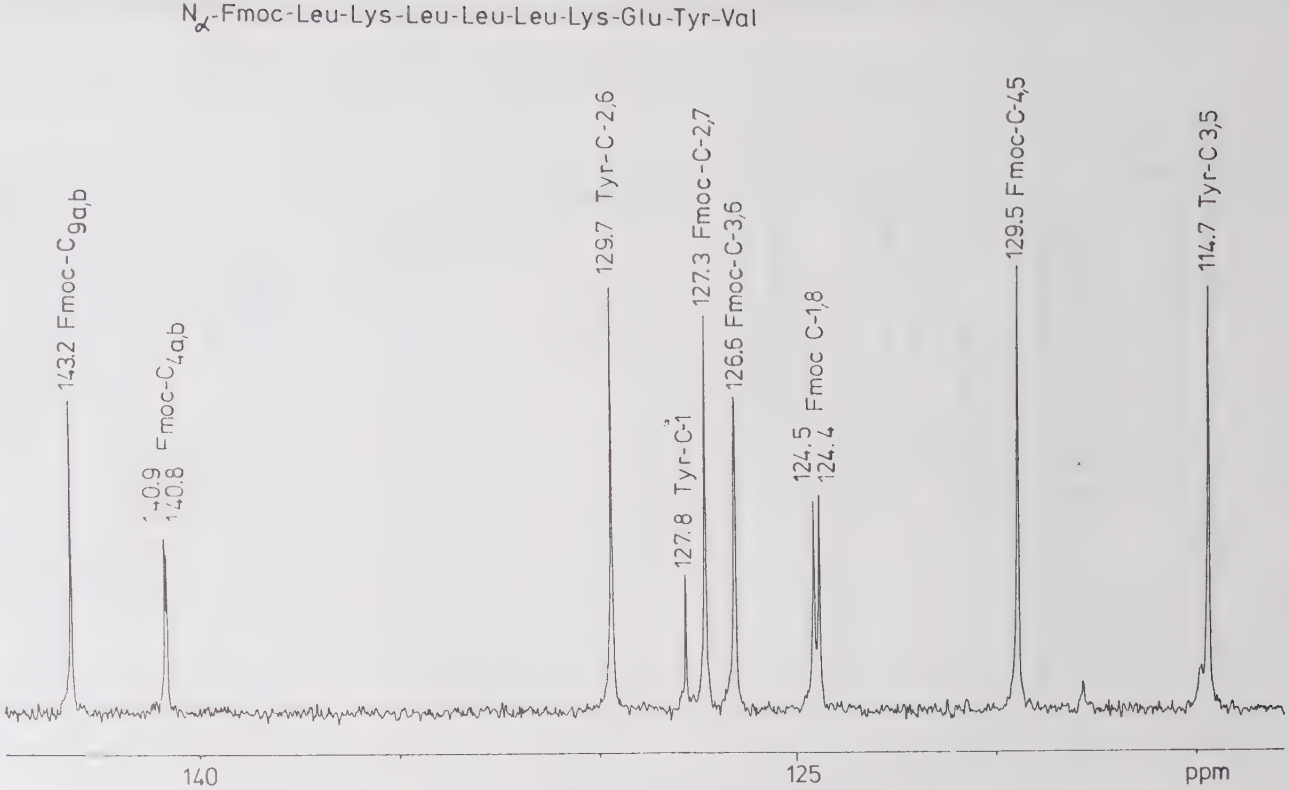


Abb. D.5: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) von N_α-Fmoc-NC-9 in $^{12}CD_3OD/^{12}CDCl_3$ (145-115 ppm Bereich)

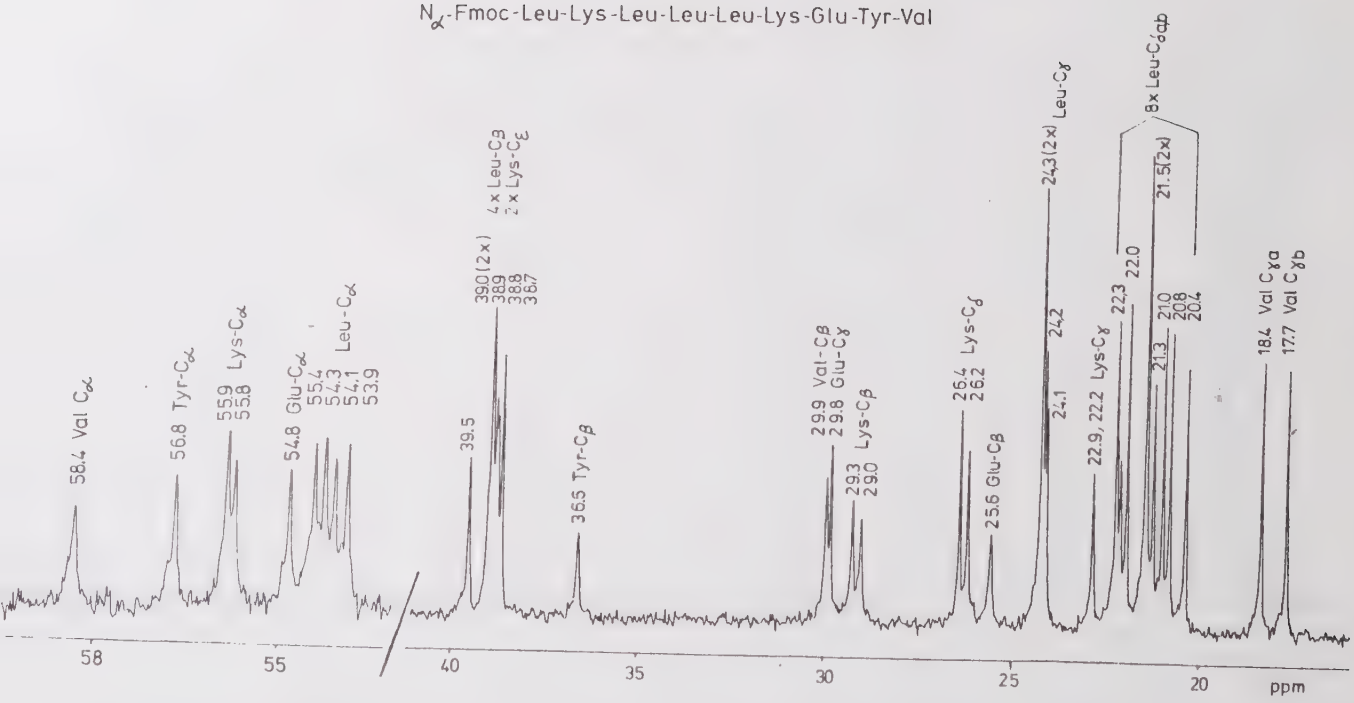


Abb. D.6: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) von N_α-Fmoc-NC-9 x 2 TFE in $^{12}CD_3OD$/ $^{12}CDCl_3$ (60-15 ppm)

Tab. D.1: ^{13}C-NMR-Verschiebungen von N_{α}-Fmoc-NC-9-OH

ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung
175.8	-COOH (10x)	119.5	Fmoc-$C_{4,5}$	29.8	Glu-C_{γ}
175.3		114.7	Tyr-$C_{3,5}$	29.3	Lys-C_{β}
174.73		67.2	Fmoc-CH_2	29.0	Lys-C_{β}
174.69(2x)		58.4	Val-C_{α}	26.4	Lys-C_{δ}
174.5		56.8	Tyr-C_{α}	26.2	
173.5		55.9	Lys-C_{α}(2x)	25.6	Glu-C_{β}
172.5		55.8		24.3(2x)	Leu-C_{γ} (4x)
172.0		54.8	Glu-C_{α}	24.2	
157.6	Fmoc-CO	54.4	Leu-C_{α} (4x)	24.1	
155.1	Tyr-C_4	54.3		22.9	Lys-C_{γ}
143.2	Fmoc-$C_{9a,b}$	54.1		22.2	
140.9	Fmoc-$C_{4a,b}$	53.9		22.3	8 x Leu-C_{δ}
140.8		46.4	Fmoc-CH	22.0	
129.7	Tyr-$C_{2,6}$	39.5	Leu-C_{β} (4x)	21.5(2x)	
127.8	Tyr-C_1	39.0(2x)		21.3	
127.3	Fmoc-$C_{2,7}$	38.9		21.0	
126.6	Fmoc-$C_{3,6}$	38.8	Lys-C_{ε} (2x)	20.8	
124.5	Fmoc-$C_{1,8}$	38.7		20.4	
124.4		29.9	Val-C_{β}	18.4	Val-$C_{\gamma 1}$
				17.7	Val-$C_{\beta 2}$

4.2. ^{13}C-NMR-Spektrum von NC-14

Weniger leicht interpretierbar ist das ^{13}C-NMR-Spektrum von NC-14 welches in $^{12}CD_3OD/D_2O$ (1:1) aufgenommen wurde (Abb. D.7, 8). Die Zuordnung wird durch das Auftreten einzelner kleinerer Signale erschwert, welche entweder von Verunreinigungen oder einem Gleichgewicht zwischen Konformeren herrühren. Die vermessene Substanz zeigt im DC zwei Spots (vgl. Kap. F.2.8.), welche die gleiche Aminosäurenanalyse zeigen.

Möglicherweise ist analog zu dem Pentapeptid γ-IFN-5 am Asparagin eine cyclische Imidbildung bzw. eine α → β oder α→γ-Transpeptidierung eingetreten. Ein Indiz dafür könnten z.B. die außergewöhnlich breiten Peaks für Asn-C_α bei 54.8 ppm und Asn-C_β bei 38.0 ppm sein. Die Doppelstruktur der Pro-C_α (63.8; 63.5 ppm), Pro-C_β (31.5; 30.9 ppm), Pro-C_γ (24.8; 24.6 ppm) und Pro-C_δ (50.6; 50.1 ppm) läßt auf eine cis/trans-Isomerie schließen (Abb. D.8). Im 18-20 ppm-Bereich findet man die 4 Signale von Ala-C_β und Leu-C_δ, die jedoch ohne weitere NMR-Experimente nicht einzeln zuzuordnen sind. Dasselbe gilt für die C_α-Signale von Ala, Asn, Asp und Phe im Bereich zwischen 51 und 56 ppm. Die C_α-Signale von Ala zwischen 51.5 und 53 ppm sind gegenüber den Ala-C_α-Signalen kurzer Peptide um 2-4 ppm nach tiefem Feld verschoben. Diese Erscheinung ist typisch für Alanin in α-helikaler Umgebung [61]. Ein indirekter Strukturbeweis wird in diesen Fällen durch das zahlenmäßig richtige Auftreten dieser Signale erbracht. Gut zuordnen lassen sich hingegen Signale von Thr-C_α (61.5 ppm), Pro-C_α (63.5; 63.8 ppm) und Thr-C_β (69.6 ppm). Wegen des dreifachen Auftreten von Glu sind die Glu-C_α, C_β und C_γ-Signale teilweise nicht mehr aufgelöst und fallen zu einem Peak zusammen (vgl. Tab. D.2). Deutlich erscheinen die Aromatensignale von Phe (z.B. Phe-C-1 bei 138.7 ppm) und das charakteristische Arg-C_ε -Signal bei 159.4 ppm (Abb. D.7).

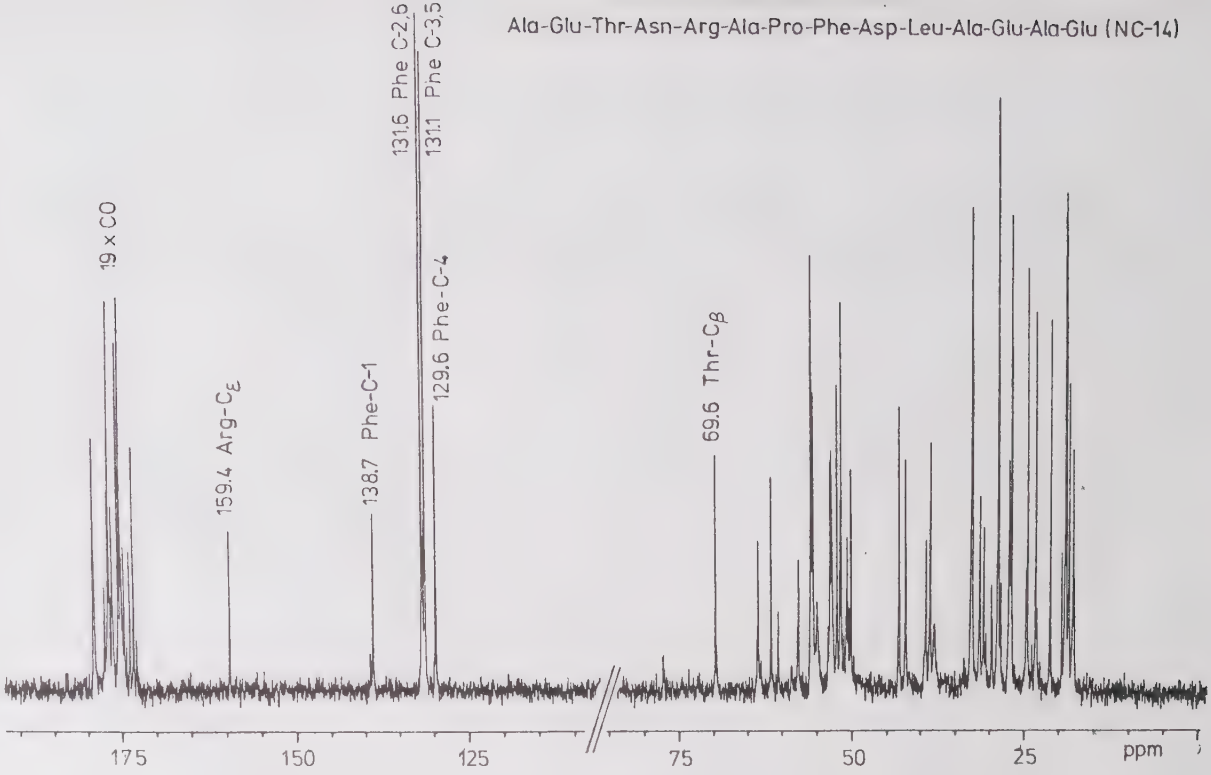


Abb. D.7: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz, $^{12}CD_3OD/D_2O$) von NC-14 x 2 HCl

Abb. D.8: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.62 MHz) in $^{12}CD_3OD/D_2O$ von NC-14 x 2 HCl
(70-15 ppm Bereich)

Tab. D.2: ^{13}C-NMR-Daten von NC-14 (100.62 MHz; $^{12}CD_3OD/D_2O$, (1:1))

ppm	Zuordnung	ppm	Zuordnung
19 C=O-Signale:		63.8 / 63.5	Pro-C_α
179.1; 178.9; 178.0;		61.5	Thr-C_α
176.9; 176.8; 176.7 (2x);		55.7	Phe-C_α, Glu-C_α
176.6; 176.2; 176.1;		55.5	Glu-C_α
175.3; 175.2; 175.0 (2x);		54.8	Asn-C_α (breit)
174.9; 174.8; 174.5;		55.4	Arg-C_α
173.7; 173.2		53.0	Asp-C_β
159.4	Arg-C	52.9	Leu-C_α
138.7	Phe-C_1	52.8	
131.6	Phe-$C_{2,6}$	52.0	4 x Ala-C_α
131.1	Phe-$C_{3,5}$	51.5 (2x)	
129.6	Phe-C_4	50.1 / 50.6	Pro-C_δ
69.6	Thr-C_β	43.1	Arg-C_δ
26.9	Arg-C_β	42.2	Leu-C_β
24.8 / 24.6	Pro-C_β	39.2	Asp-C_β
23.4	Leu-C_γ	38.6	Phe-C_β
21.2	Thr-C_γ	38.0	Asn-C_β (breit)
		32.7 (3x)	Glu-C_γ
		31.5 / 30.9	Pro-C_β
		28.9	Arg-C_β
		27.2	Glu-C_β
		19.2 (2x)	Ala-C_β; Leu-$C_{\delta 2}$
		19.0 (2x)	Ala-C_β; Leu-$C_{\delta 1}$
		18.6	Ala-C_β
		18.0	Ala-C_β

Das scharfe Arg-C_ε -Signal ohne jeglichen Nebenpeak läßt eine vollständige Abspaltung der Guanidino-Mtr-Schutzgruppe erkennen.

5. CD-Spektren

5.1. CD-Spektrum von NC-9

Eine relative begrenzte Aussagekraft hat das CD-Spektrum von NC-9 (Abb. D.9), welches im sauren und alkalischen pH-Bereich aufgenommen wurde. Bei 199-200 nm findet man einen stark negativen Cotton-Effekt ($\pi\pi^*$-Übergang), dessen Blauverschiebung gegenüber einer idealen α-Helix (208 nm) auf ρ-Konformationsanteile (Knäuelstruktur) schließen läßt. Bei pH 11 erkennt man bei 220 nm die Bande für den $n\pi^*$-Übergang von α-Helices, welche sich beim Ansäuern ebenfalls nach Blau (215 nm) verschiebt. Die Ergebnisse aus dem CD-Spektrum von NC-9 stehen somit in keinem direkten Widerspruch zu den Konformationsvorhersagen nach der Methode von Chou und Fasman (vgl. Abb. D.9), wonach α- und ρ -Konformationsanteile zu erwarten sind.

5.2. CD-Spektrum von NC-14

Im alkalischen Bereich (pH 11) zeigt das CD-Spektrum von NC-14 zwischen 210 und 230 nm drei ungewöhnliche kleinere Banden (Abb. D.10). Es ist nicht auszuschließen, daß sie durch Überlagerung von Beiträgen einer α-Helix und von Reverse Turns herrühren bzw. der Ausdruck eines Konformaticnsgleichgewichts sein können. Die drei Banden verschwinden teilweise wieder beim Ansäuern, bis auf eine Absorption bei 228 nm, welche zusammen mit der stark negativen CD-Bande bei 206 nm eindeutig auf α-Helixanteile schließen läßt. Obwohl aus den CD-Daten kein direkter Hinweis auf

Reverse Turns zu entnehmen ist, widersprechen die Ergebnisse nicht den Konformationsvorhersagen (Abb. D.10).

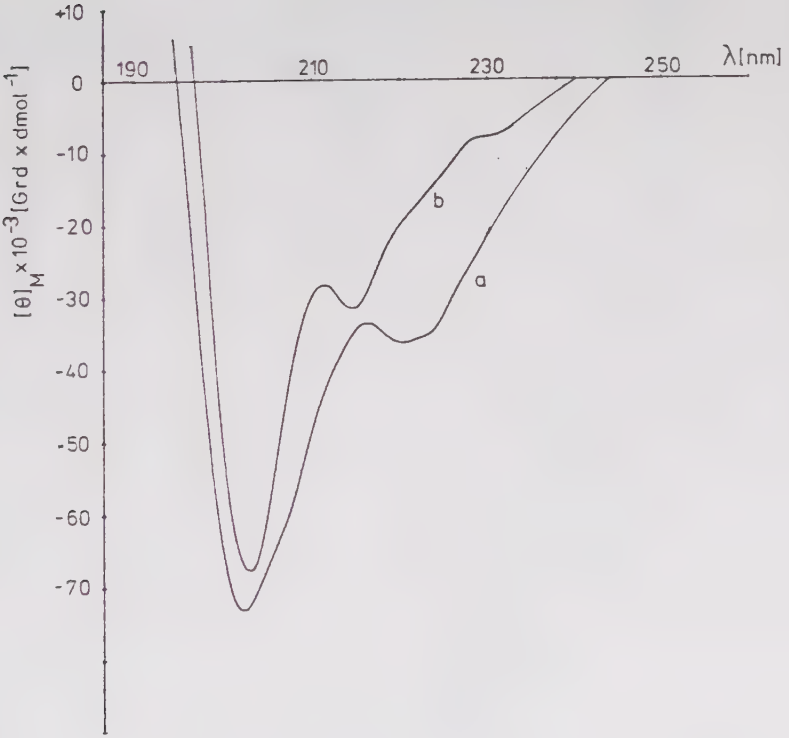


Abb. D.9: CD-Spektrum des Nonapeptids NC-9 bei pH 11 (a) pH 4 (b) [c ~1 mg/ml]

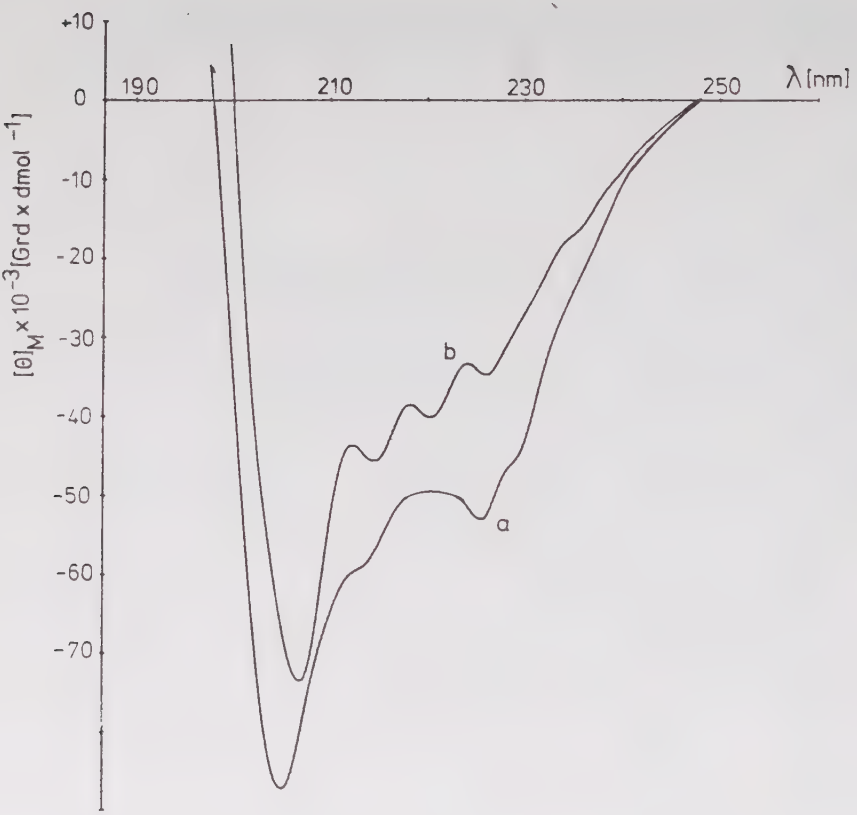


Abb. D.10: CD-Spektren des Tetradecapeptids NC-14 in 50 % Ethanol bei pH 4 (a) und pH 11 (b) [c ≈ 1 mg/ml]

6. Massenspektrometrie von NC-9 und NC-14

Von dem ungeschützten Nonapeptid NC-9 wurde ein FD-Massenspektrum aufgenommen. In Abb. D.11 erkennt man den erwarteten M^+-Peak bei 1118, sowie die entsprechenden (M^++H, 2H, 3H)-Peaks. Von dem ungeschützten NC-14-Peptid wurde im FD-Massenspektrum kein M^+-Peak erhalten, sondern lediglich eine unspezifische Fragmentierung bei 768. Dies dürfte auf eine ungeeignete Probenvorbereitung zurückzuführen sein.

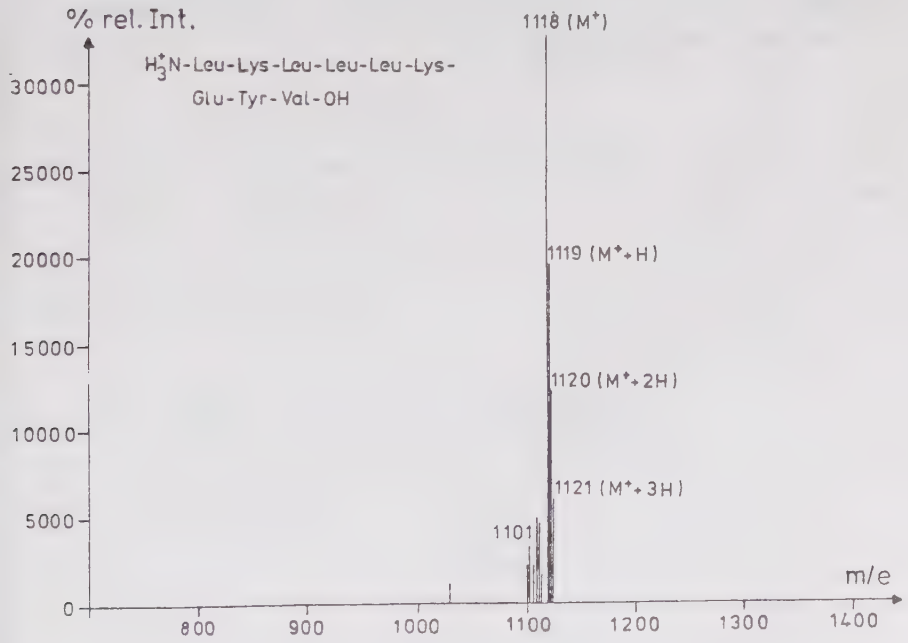


Abb. D.11: FD-Massenspektrum von NC-9 (Ionenquellentemperatur 64°C)

7. Immunologische Ergebnisse

Die Antiseren, welche als "Sonde" zur Auffindung des neuen Proteins dienen, erhält man durch Immunisierung von Kaninchen mit NC-9, NC-14 und deren BSA-Konjugate.

Überraschenderweise ergaben die reinen Peptide gleich gute positive Antikörper-Titer wie die BSA-NC-Peptidkonjugate. Anscheinend reicht bereits deren Molmasse von ca. 1000 (NC-9) bzw. 1500 (NC-14) zur Antikörperbildung aus. Zum Nachweis bzw. Identifizierung des erwarteten neuen Proteins wurden zwei Methoden angewandt:

7.1. Immundekorierung

Bei der Immundekorierung (engl. immune decoration) werden folgende Arbeitschritte durchgeführt [177]:

1) Gelelektrophorese von einer mitochondrialen Proteinmischung (aus Membranen) (Abb. D.12a).
2) Übertragung der Gelbanden auf Nitrocellulose durch Elektro-Plotting (Abb. D.12b).
3) Immunreaktion mit transferiertem Material
   a) Absättigung der nicht besetzten Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose mit BSA-Lösung (Abb. D.12c).
   b) Inkubation mit spezifischem Antiserum (IgG) gegen das NC-Peptid (Abb. D.12c).
   c) Nachweis der Bindung mit IgG mit ^{125}Iod-markiertem Protein A (bindet nur an F_c-Teil des IgG) (Abb. D.12d).
   d) Autoradiographie durch Auflegen eines Röntgenfilms auf Nitrocellulose (Abb. D.12e).

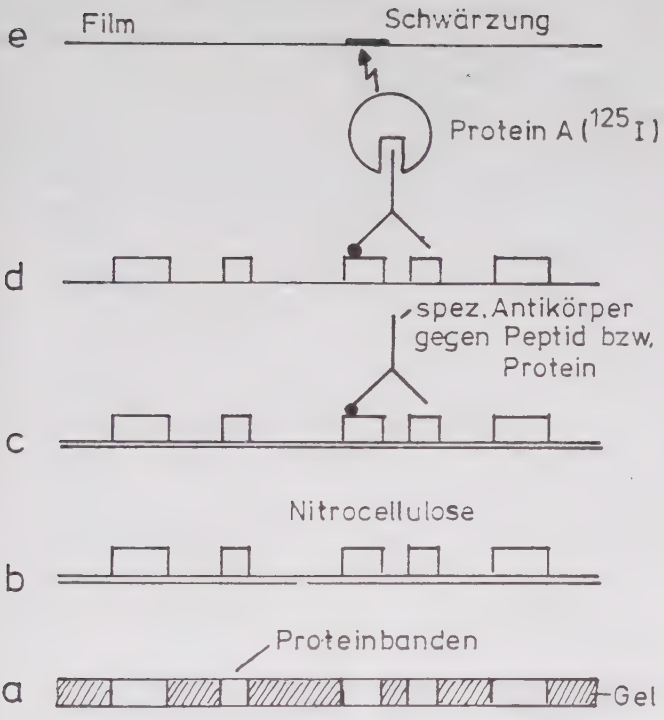


Abb. D.12: Schema der Immundekorierung

Mit den NC-9-Antiseren gelang der Nachweis eines neuen Proteins. Der Nachweis war allerdings nur bei der Verwendung von denaturiertem Protein (SDS, 5 min bei 90°C) positiv, jedoch nicht bei nativem Protein (Abb. D.13). Dies ist ein deutlicher Beweis dafür, daß die NC-9-Sequenz im

Inneren des Proteins liegt und erst durch Entfaltung (Denaturierung) des Proteins dem Antikörper zugänglich ist.

Abb. D.13: Autoradiogramm eines Nitrocellulosestreifens (welcher die im SDS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennten Mitochondrienproteine enthält) nach Inkubation mit spezifischem NC-9-Antiserum und ^{125}Iod-Protein A.

* Das Molekulargewicht des neuen Proteins wurde durch Kalibrierung mit bekannten Proteinen (Rinderserumalbumin, Pepsin, Hühnereinweißalbumin, Trypsinogen, β-Lactoglobulin und Lysozym), auf ca. 40 000 bestimmt. Dieses Resultat stimmt sehr gut mit dem erwarteten Molekulargewicht aus der URF-1-Sequenz überein.

Ein ebenfalls positiver Protein-Nachweis gelang mit einem NC-14-Antiserum im nativen Zustand* (Abb. D.14). Dieses positive Resulat ist eine schöne Bestätigung dafür, daß die NC-14-Sequenz auf der Proteinoberfläche lokalisiert ist**.

Abb. D.14:
Autoradiogramm eines Nitrocellulose-streifens nach Inkubation mit NC-14-Antiserum und ^{125}Iod-Protein A.

---

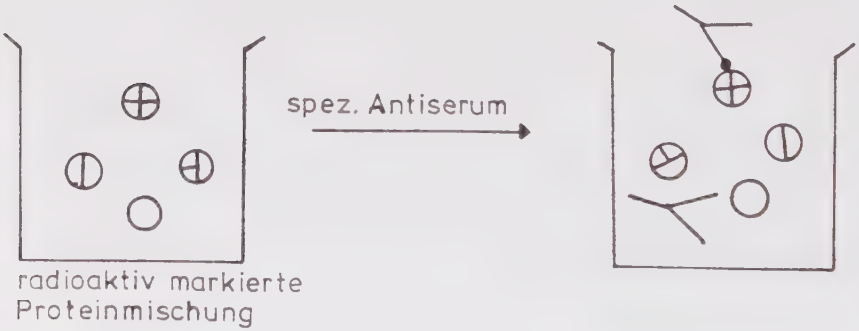
* Bis zum Abschluß dieser Arbeit wurde zweimal ein positiver Proteinachweis mit einem NC-14-Antiserum erhalten. Die Bestätigung dieser Ergebnisse mit anderen Antiseren steht noch aus.

** Für die Durchführung der immunologischen Tests und für wertvolle Diskussionen danke ich Herrn Prof. Dr. S. Werner und Frau Zauner vom Institut für Physiologische Chemie der Universität München.

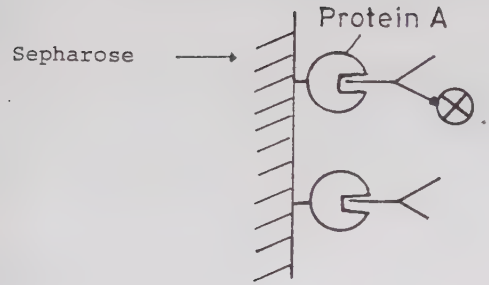
Der Nachweis des neuen Proteins kann auch mit der im folgenden beschriebenen Methode erfolgen. Es besteht bei diesem Nachweis allerdings die Gefahr der Verschleppung von Verunreinigungen.

7.2. Nachweis des Proteins mit radioaktiv markiertem Antigen

1) Spezifische in vitro Markierung von mitochondrialen Proteinen mit radioaktiven Aminosäuren in Gegenwart von Cycloheximid (Cycloheximid blockiert die Synthese der Proteine, welche in der Zell-DNA codiert sind) [179a].
2) Isolierung von Mitochondrien
3) Solubilisierung der mitochondrialen Proteine mit Detergentien.
4) Inkubation mit spezifischem Antiserum.

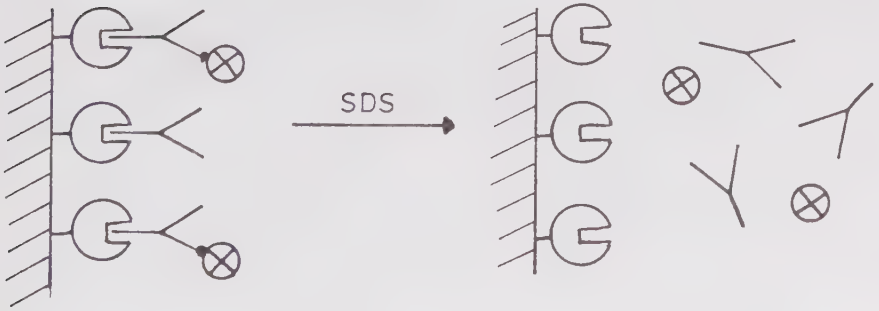


5) Bindung des gebildeten Antigen-Antikörperkomplexes an Protein A, welches an Sepharose immobilisiert ist; gleichzeitig werden auch andere unspezifische IgG-Moleküle gebunden.



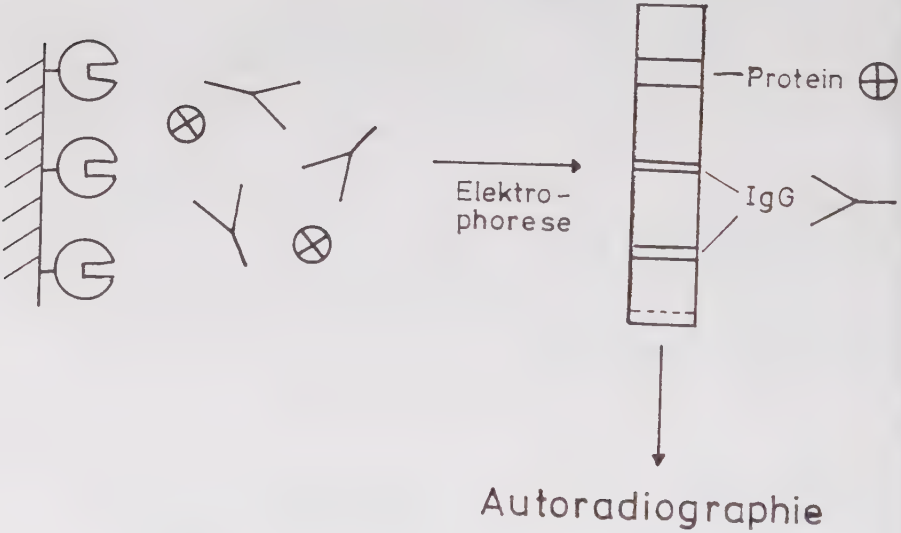
6) Abtrennung der Sepharose von den anderen ungebunden Proteinen.

7) Dissoziation des Antigens (gesuchten Proteins) mit hohen Konzentrationen an SDS.



8) Elektrophoretische Auftrennung der Mischung aus IgG-Molekülen und dem gesuchten radioaktiv markierten Protein.

9) Autoradiographie des getrockneten Gels, oder Bestimmung der Radioaktivität des in kleine Fraktionen geschnittenen Gels.



E. ENTWICKLUNG UND SYNTHESE EINES NEUEN VERBRÜCKUNGS-REAGENS (CROSSLINKER)

Der Bedarf an spezifischen Crosslinkern zur Kupplung von Peptiden und biologischen Wirkstoffen an Proteine und synthetische Träger nimmt ständig zu. In dieser Arbeit wurde ein heterobifunktionelles Reagens entwickelt, mit welchem z.B. Peptide spezifisch N-terminal an Proteine und andere Träger gekuppelt werden können [180]. Dies ist vor allem für die Herstellung synthetischer Antigene, sowie für die Immunobilisierung von Enzymen von Bedeutung.

Das neue Verbrückungsreagens besitzt folgende allgemeine Formel:

X-NH-NH-CO-A-CO-B-Y I

Es bedeutet:

X = Boc, Z, Fmoc oder andere Schutzgruppen
Y = OH, OSu oder andere Aktivestergruppen
A = Ethylen- oder Propylengruppe
B = Bindung oder Aminosäurebaustein.

Verbindungen des Typs I besitzen latente Heterobifunktionalität, d.h. Kupplungen mit solchen Reagentien können in 2-stufiger Arbeitsweise ausgeführt werden:

a) Der Aktivester, bzw. die mit DCC/HOBt, DCC/HOSu aktivierte COOH-Gruppe, reagiert in der ersten Stufe mit Aminogruppen einer bestimmten Verbindung (Polymer, Peptid, etc.),

b) in dem darauffolgenden zweiten Schritt wird die Schutzgruppe X abgespalten, das entstandene Hydrazid ins Azid übergeführt, welches unter schonenden Bedingungen mit Aminogruppen einer anderen Komponente (Polymer, Peptid, etc.) reagiert.

1. Synthese der Crosslinkerverbindungen

1.1. Synthese der Hydrazidosuccinyl (HSc)-Crosslinker

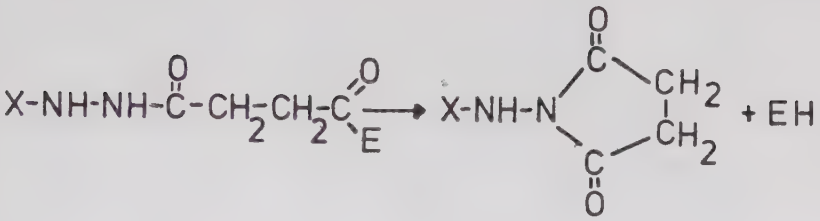
Zu Beginn wurden Verbindungen dargestellt, welche den Succinylrest Sc als Grundkörper enthalten, B eine Bindung und Y eine OH-Gruppe darstellt (vgl. allg. Formel I):

$$X\text{-}NH\text{-}NH\text{-}CO\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH \qquad II$$

X = Fmoc, Boc, Z

Verbindungen vom Typ II als X-HSc-OH (HSc: Hydrazidosuccinyl) bezeichnet , erhält man durch Umsetzung eines geschützten Hydrazinderivats $X\text{-}NH\text{-}NH_2$ mit Bernsteinsäureanhydrid in einem inerten wasserfreien Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydrofuran, Methylenchlorid, Dimethylformamid etc. (Abb. E.1). Die Reaktion ist nach 2 h bei Raumtemperatur nahezu quantitativ abgelaufen. Nach Verdampfen der Lösungsmittel im Vakuum werden die X-HSc-OH-Derivate durch Umkristallisieren aus Essigester/Petrolether in guten Ausbeuten ($\geqslant$ 80 %) erhalten.

Mehrere Versuche die kristallinen X-HSc-OH-Verbindungen mittels DCC/HOSu, Carbonyldiimidazol/HOSu oder Disuccinimidcarbonat (DSC) in die entsprechenden N-Hydroxysuccinimidester überzuführen scheiterten. Es tritt vielmehr intramolekulare Cyclisierung zum Pyrrolidin-2,5-dion auf. Der Ringschluß kann bereits bei der Carbodiimid-Aktivierung über das aktive N-Acylureid oder erst nach Bildung des Succinimidesters erfolgen:



E: aktivierte Austrittsgruppe

Ähnliches Verhalten kennt man z.B. von N-Acyl-Asparaginsäure(β-ester)-C_α-amiden, welche im leicht alkalischen Milieu fast quantitativ cyclisieren [181-183]. Die Pyrrolidin-2,5-dion-Produkte, z.B. von Boc-HSc-OH können wegen ihrer guten Kristallisationsfähigkeit leicht aus der Reaktionsmischung isoliert werden. Verlängert man die Alkylenkette um eine CH_2-Gruppe indem man Glutarsäureanhydrid verwendet, wird bei der Aktivestersynthese mit DCC/HOSu ebenfalls eine Cyclisierung zum Piperidin-2,6-dion beobachtet.

Wegen der Tendenz zu derartigen Ringschlüssen, muß der Aktivester in situ in Gegenwart der Aminkomponente gebildet werden. Die X-HSc-OH-Derivate werden dabei in einem leichten Überschuß zur Aminoverbindung eingesetzt. Die Reaktion des in situ gebildeten Aktivesters mit Aminogruppen erfolgt innerhalb von 2-3 h quantitativ ohne weitere Nebenreaktionen (vgl. Abb. E.1).

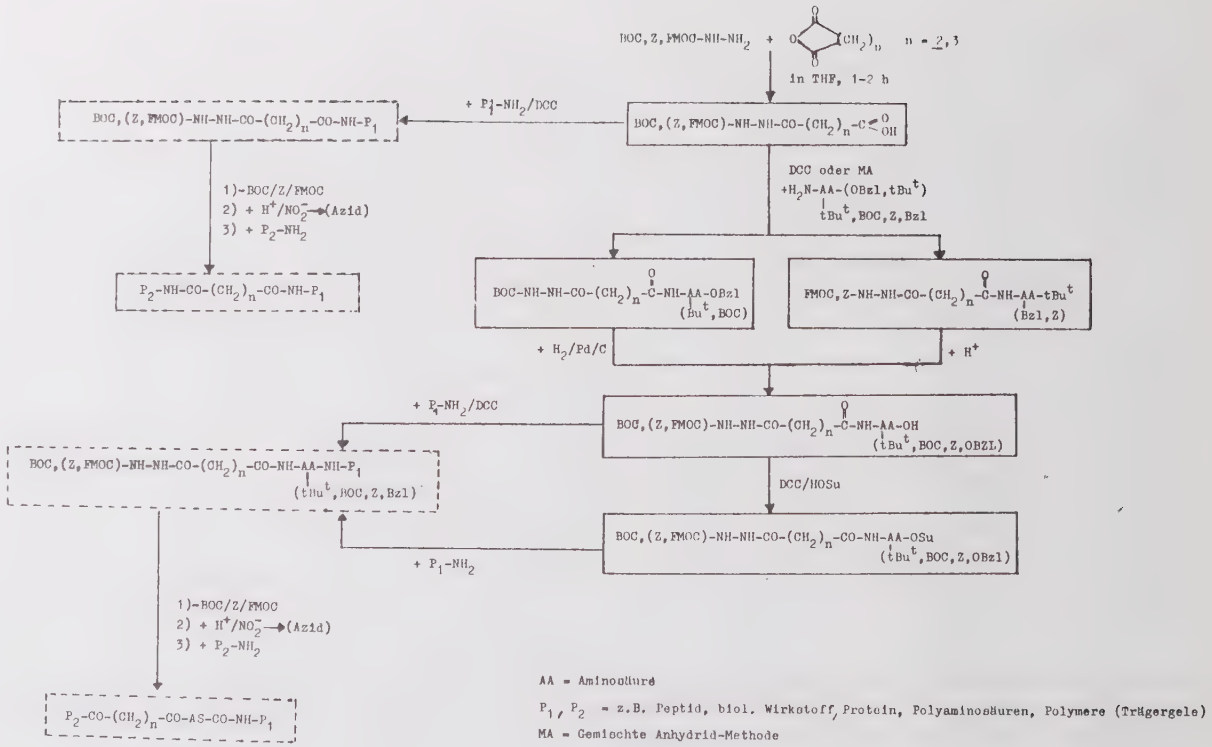


Abb. E.1: Schema der Synthesen unter Verwendung des Crosslinkers HSc

1.2. Synthese der Hydrazidosuccinyl(HSc-)-Aminosäure-Crosslinker

Durch Ankupplung von Aminosäuren an die X-HSc-OH-Derivate ist es möglich die geschilderten Cyclisierungsreaktionen zu umgehen und N-Hydroxysuccinimidester darzustellen. Setzt man z.B. X-HSc-OH mittels DCC/HOBt mit N_{α}-ungeschützten Glycinestern (H-Gly-OtBu, H-Gly-OBzl) um, erhält man zuerst die X-HSc-Gly-OtBu(OBzl)-Verbindung. Nach hydrolytischer (H^+) bzw. hydrogenolytischer ($Pd/C/H_2$) Entfernung der Esterschutzgruppe wird die freie Säure X-HSc-Gly-OH erhalten, welche ohne Schwierigkeiten mit DCC/HOSu in den N-Hydroxysuccinimidester übergeführt werden kann. Die erhaltenen Aktivester, zu 90-95 % rein, fallen meist als ölige Substanzen an; sie sind bei $4^{\circ}C$ über mehrere Wochen haltbar.

Die X-HSc-Gly-OSu-Derivate werden zur Reaktion mit Aminogruppen in einem leichten Überschuß eingesetzt. Die Reaktion mit H-Phe-OtBu ist z.B. nach 1-2 h quantitativ. Wie die X-HSc-OH-Derivate können auch die X-HSc-Gly-OH-Verbindungen mit DCC/HOBt äquimolar mit Aminogruppen gekuppelt werden.

Anstelle von Glycin kann jede andere Aminosäure in der entsprechend geschützten Form eingesetzt werden. Glycin hat den Vorteil, daß es achiral ist und wegen Fehlens einer Seitenfunktion keine immunogenen Eigenschaften besitzt. Die Kupplung der Crosslinkerderivate an feste und lösliche Stoffe kann mittels Aminosäurenanalyse oder gaschromatographisch an chiralen Phasen wie Chirasil-Val (vgl. Kap. C.1.1.), quantitativ überprüft werden.

2. Kupplung der Crosslinker-Derivate

Nach Abspaltung der Hydrazidschutzgruppe X (X = Boc, Fmoc, Z) unter den üblichen Bedingungen, kann das entstandene Hydrazid entweder nach der Methode von Honzl-Rudinger mit tert. Butylnitrit/H^+ oder nach Medzihradsky mit $NaNO_2/H^+$ ins Azid übergeführt werden. Das Azid reagiert bei 4^oC und pH 7-8 vorzugsweise mit Aminogruppen. Die Schutzgruppenabspaltung und die Azidbildung kann erst erfolgen, wenn die N-Hydroxysuccinimidester umgesetzt sind. Bei den X-HSc-OH, bzw. X-HSc-Aminosäuren hingegen kann auch zuerst das Azid gebildet werden und danach die zweite Kupplung via DCC/HOBt erfolgen.

Voraussetzung für die Anwendung der Crosslinker-Verbindungen ist, daß die bereits angekuppelten Verbindungen unter den Bedingungen der Schutzgruppenabspaltung und der Azidbildung (pH 1-2, 5 min bei -20^oC) stabil sind. Anscheinend sind Serumalbumine, wie HSA oder BSA, welche den sauren Bedingungen bei der Kupplung von Antigenen ausgesetzt waren, nach wie vor gute Immunogene [185].

Nach Delaage führt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen an BSA-Konjugaten mit Piperidin zu keiner Denaturierung des Proteins [187]. Sehr widersprüchlich sind dagegen die Angaben über die Auswirkung der Boc-Abspaltung (konz. Trifluoressigsäure oder 1.2 N HCl/Eisessig) auf Denaturierung und Immunogenität des Proteins [186]. So wurde kürzlich wieder von keiner Beeinträchtigung berichtet (18. Eur. Pept. Symp., Stockholm 1984). Eine wichtige Bedingung um definierte Kupplungsprodukte zu erhalten ist, daß die Azid-Crosslinkerverbindung keine ungeschützten Aminogruppen enthält, was zur Selbstkondensation führen könnte (vgl. Kap. B.4.3.).

3. ^{13}C-NMR-Spektroskopie der Crosslinker-Derivate

Sämtliche NMR-Daten der synthetisierten Produkte sind im experimentellen Teil im Anschluß an die jeweiligen Synthesevorschriften zu finden. Die Zuordnung der Signale bereitet keine Schwierigkeiten. So findet man bei den X-HSc-Verbindungen die Succinyl-CO-Signale je nach Schutzrest X im Bereich zwischen 170 und 180 ppm, die Succinyl-CH_2-Gruppen erscheinen zwischen 29 und 33 ppm.

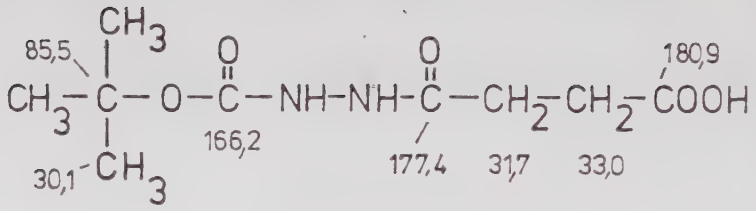
Abb. E.2a und 2b zeigen die ^{13}C-NMR-Werte von Boc-HSc-OH und dem Pyrrolidin-2,5-dion-Derivat, welches durch Cyclisierung der Boc-HSc-Aktivesterverbindung entstanden ist. Die Sc-CO-Signale von Boc-HSc-OH bei 177.4 ppm und 180.9 ppm fallen zu einem Peak bei 174 ppm zusammen. Die Succinyl-CH_2-Gruppen, ursprünglich bei 31.7 und 33.0 ppm werden nach höherem Feld verschoben und erscheinen als Einzelsignal bei 26.2 ppm.

Im Spektrum von Boc-HSc-Gly-OH (Abb. E.3) erscheint Gly-CO bei 176.3 ppm und Gly-C_α bei 43.7 ppm.

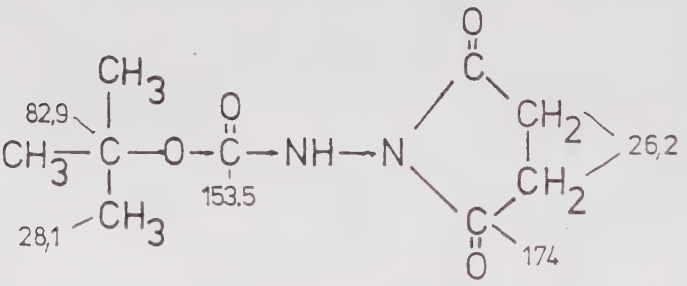
4. Weitere Anwendungen der HSc-Crosslinkerverbindungen

Die HSc-Crosslinker sind geeignet,um Haptene (Peptide, biolog. aktive Wirkstoffe etc.) an feste und lösliche Träger zu kuppeln (Proteine, Polyaminosäuren, Trägergele, etc.). Kuppelt man den X-HSc-Gly-Crosslinker an unlösliche Träger (z.B. Sepharose) und bildet das Azid, so können unter den sehr milden Bedingungen (pH 7-8, 4°C) Enzyme immobilisiert werden. Der HSc-Gly-Crosslinker ermöglicht eine 7-gliedrige Verbindung zwischen Träger und Enyzm. Eine 4-gliedrige Verbindung wird bei Verwendung der X-HSc-OH-Derivate erhalten.

a



b



Werte in ppm

Abb. E.2: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale von Boc-HSc-OH in D_2O (a) und cyclisiertem Boc-HSc-OH (Pyrrolidin-2,5-dion) (b) in D_2O.

Die HSc- bzw. HSc-Aminosäurenderivate können direkt als N-terminaler Baustein zur klassischen Peptidsynthese und zur Merrifield-Synthese verwendet werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen kann das Peptid gezielt N-terminal an Biopolymere oder Trägergele gekuppelt werden. Durch den Einsatz der verschiedenen Schutzgruppen (X = Boc, Fmoc, Z, etc.) erhält man eine große Variationsbreite der zu kuppelnden Verbindungen.

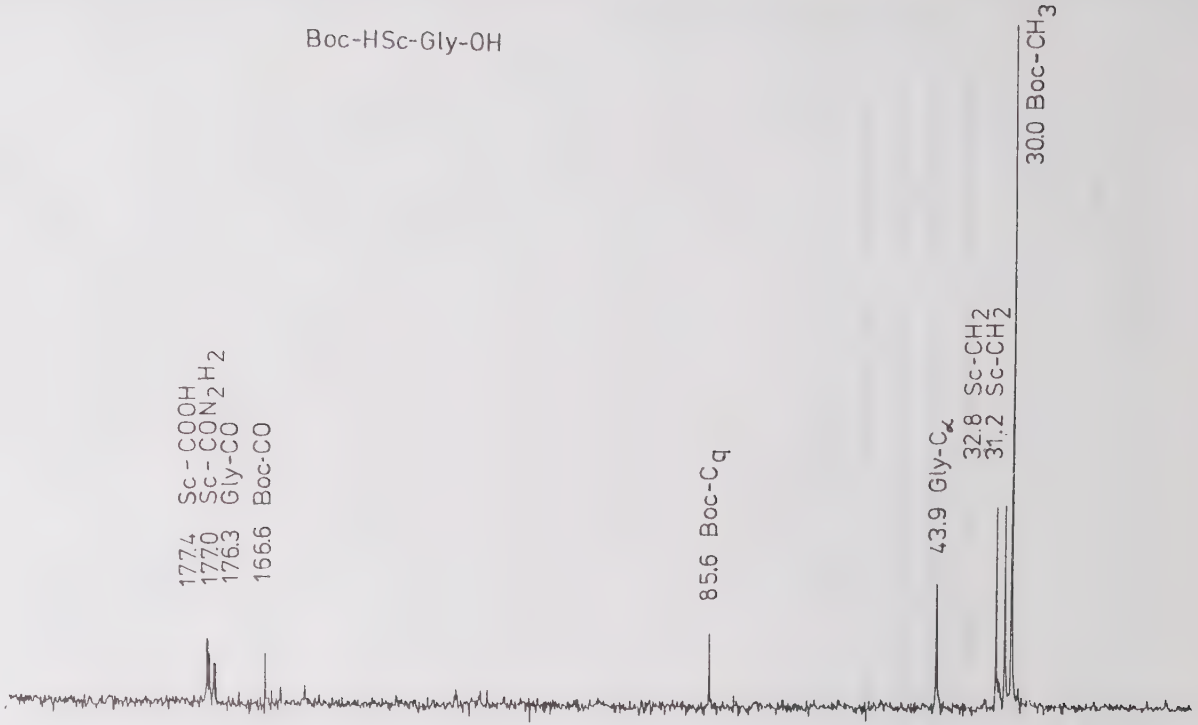


Abb. E.3: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz, D_2O) von N^{α}-(N^{h}-tert. Butyloxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-glycin (Boc-HSc-Gly-OH)

Ein weiterer Vorteil der X-HSc-Aminosäureverbindungen besteht darin, daß über ^{14}C und ^{3}H-markierte Aminosäuren bzw. über ^{125}Iod markiertes Tyrosin leicht hohe radioaktive Markierungen eingeführt werden können.

Zuletzt sei erwähnt, daß sich die X-HSc-OH-Derivate bzw. X-HSc-Aminosäuren in Lösungsmitteln wie Dimethylformaid, Methanol, Tetrahydrofuran, Methylenchlorid etc. ausgezeichnet lösen, wobei die Boc-HSc-OH bzw. Boc-HSc-Gly-OH(OSu)-Verbindungen zusätzlich noch wasserlöslich sind.

F. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Chemikalien und Methoden

Alle Lösungsmittel p.a. wurden von der Firma Merck und Fluka bezogen, bzw. nach üblichen Methoden getrocknet und destilliert. DMF und NMM wurden zur Beseitigung von sek. Aminen über Ninhydrin destilliert.
Aminosäuren stammten von der Fa. Merck. Aminosäurederivate, sofern nicht nach literaturbekannten Methoden selbst synthetisiert [130], wurden von der Fa. Bachem (Schweiz) bezogen.

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Merck)

Fließmittelsysteme (v/v)

I	=	$CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O	(65:25:3:4)
II	=	$CHCl_3$/MeOH/AcOH	(55:5:1)
III	=	$CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O	(35:45:3:4)
IV	=	$CHCl_3$/MeOH/konz. NH_3/H_2O	(65:35:3:4)
V	=	$CHCl_3$/MeOH	(95:5)
VI	=	n-Butanol/AcOH/H_2O	(2:1:1)
VII	=	iso-Propanol/AcOH/H_2O	(3:1:1)
VIII	=	n-Butanol/AcOH/Pyridin/H_2O	(4:1:1:2)
IX	=	$CHCl_3$/MeOH/HAc/H_2O	(2:2:1:1)
X	=	$CHCl_3$/MeOH/konz. NH_3	(95:5:1)
XI	=	$CHCl_3$/MeOH/konz. NH_3	(55:5:1)
XII	=	$CHCl_3$/MeOH/konz. NH_3	(80:5:1)

Sprühreagentien

A = 0.3 proz. Ninhydrin-Lösung in 1-Butanol/Eisessig 100:3 (v/v)

B = Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan (TDM-Reagenz) [188]

C = Bartons-Reagenz auf Hydrazide [189]

D = Entwickeln in gesättigter Iodkammer (geeignet für Bernsteinsäurederivate)

Säulenchromatographie

Präparative Trennungen wurden an Sephadex G-10, G-15 und LH-20 (Pharmacia) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels DC.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Doppelkolbenpumpe der Firma Waters, Modell 6000 A, UV-Detektor der Fa. Schoeffel, Spectroflow-Monitor 770.
HPLC-Säulen:
Lichrosorb-NH_2 von Merck (7 µm; 3.9 x 300 mm) und
Hypersil-ODS von Shandon (5 µm; 8 x 250 mm).

Die Schmelzpunkte wurden nach Tottoli ermittelt und sind nicht korrigiert.

Aminosäurenanalyse

Die Peptide wurden mit 6 N HCl 24 h unter Zusatz von 2 % (v/v) Thioglykolsäure (Fluka) [190] hydrolysiert.
Bei der Festphasenpeptidsynthese wurden 5-6 mg Harz 3 h bei 140°C unter Rühren in einem Hydrolyserohr mit 12 N HCl/Propionsäure 1:1 (v/v) hydrolysiert, und nach Abtrennung von Polymerbestandteilen zur Analyse gegeben.

Die Aminosäuren des Hydrolysats wurden mit einem automatischen Chromatographiesystem LC 6000 E der Fa. Biotronik bestimmt*.
Die Enantiomerenreinheit der hydrolysierten Aminosäuren wurde gaschromatographisch an Chirasil-Val-Quarz-Kapillarsäulen [191] bestimmt. Dazu wurden die Aminosäuren in die Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester überführt. Die ermittelten Prozentanteile an D-Aminosäuren sind, sofern nicht angegeben, nicht auf hydrolysebedingte Racemisierung [191] korrigiert.

Elementaranalysen

C, H, N-Einfachbestimmungen mit dem Elemental-Analyzer Modell 1104 (Carlo Erba, Mailand)**.

Circulardichroismus

Dichrograph Roussel-Jouan CD 185. Die CD-Daten sind als circulardichroitische Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_M$ angegeben. Der Berechnungsmodus bei den Peptid-Polymerkongugaten ist jeweils an betreffender Stelle erläutert.

Optische Drehpunkte

Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer. Schichtdicken der Meßküvetten 10 cm und 1 cm.

---

* Für die Durchführung der Analysen danke ich Frau M. Munari, Tübingen

** Herrn Wurmstich danke ich für diese Analysen

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer WP-80 (20.115 MHz für ^{13}C), WM 400 (100.62 MHz für ^{13}C) und HFX 90 (90 MHz für ^{1}H) der Fa. Bruker-Physik (Karlsruhe)*.

Massenspektroskopie

Massenspektren wurden an einem Massenspektrometer MAT 711 (Varian, Bremen) aufgenommen, das mit dem Datensystem SS 200 gekoppelt ist**. Die Ionenquellentemperatur betrug bei den FD-Massenspektren 64°C, bei der Fast Atom (Argon) Bombardement (FAB)-Methode 30°C.

Elektrophorese

CAMAG-Power Supply-Hochspannungslektrophoresegerät.
Cellulose-Glasplatten 10 x 20 cm (Fa. Merck)
Detektion: Ninhydrin-Reagenz, Referenz: Lysin und Glutaminsäure

---

* Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich R. Betthauer, B. Maier und Dr. K. Albert.

** Mein herzlicher Dank gilt Herrn H. Bartholomä für die Durchführung der massenspektrometischen Messungen.

2. Peptidsynthesen nach der Festphasenmethode

Für die Synthese der Peptide nach der Festphasenmethode von Merrifield [103,129] wurde ein Poly-(Styrol-1 % Divinylbenzol)-Copolymer (PS-DVB) mit der säurelabilen p-Alkoxybenzylalkohol-Ankergruppe [80] verwendet.

Die zum Peptidaufbau verwendeten N_α-Fmoc-(Boc, OtBu, tBu)-Aminosäuren [111-115] wurden sofern nicht selbst synthetisiert von der Fa. Bachem bezogen. Die Synthesezyklen (vgl. Tabelle 1) wurden mit einer halbautomatischen Schüttelmaschine in einer Schüttelente (100 ml für ca. 5 g Harz) mit eingebauter Glasfritte durchgeführt.

Piperidin p.a. (Fluka) wurde vor Gebrauch über NaOH-Plätzchen im Vakuum destilliert. DMF und N-Methylmorpholin p.a. müssen unbedingt aminfrei sein und werden deshalb unmittelbar vor Gebrauch über Ninhydrin i. Vak. destilliert.

2.1. Kupplung der ersten N_α-Fmoc-Aminosäure an das p-Alkoxybenzylalkohol-Trägerharz

Die Fmoc-Aminosäure (19.2 mmol) wird in 30-40 ml DMF/CH_2Cl_2 1:1 (v/v) bei 0°C mit DCC (1.97 g, 9.6 mmol) versetzt. Nach 30 min wird von ausgefallenem Harnstoff direkt in eine Schüttelente abfiltriert, in welcher sich p-Benzyloxybenzylalkohol-Harz (5 g, 3.2 mmol OH-Gruppen) befinden. Nach Zugabe von Pyridin (9.6 mmol) wird 1 h bei 4°C und 12-18 h bei Raumtemp. geschüttelt. Das Lösungsmittel wird abgesaugt und das Harz je 3 x mit je 30-50 ml DMF, CH_2Cl_2, DMF gewaschen. Das Harz wird in 30-50 ml CH_2Cl_2 bei 4°C in der Schüttelente zuerst mit Pyridin (57.6 mmol, 6 Äq.) und dann mit Benzoylchlorid (57.6 mmol, 6 Äq.) versetzt. Man schüttelt 30 min bei 4°C und 1 h bei Raumtemp.

Das Harz wird abfiltriert und je 3 x mit 30-50 ml CH_2Cl_2, DMF, Isopropanol und PE-30/50 gewaschen.

Beladungsbestimmung am Trägerharz

5-6 mg Harz werden 15 min mit 5 ml Piperidin/DMF 1:1 (v/v) behandelt, mit CH_2Cl_2, DMF, CH_2Cl_2, PE-30/50 gewaschen und gut im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.
Eine definierte Menge getrocknetes Harz wird 3 h bei 140°C mit 12 N HCl/Propionsäure unter Rühren hydrolysiert und der Aminosäuregehalt im Aminosäurenanalysator bestimmt.

2.2. Symmetrische Fmoc-Aminosäureanhydride (allg. Vorschrift)

Die Fmoc-Aminosäure (19.2 mmol, 6 Äq.) wird in 20-30 ml CH_2Cl_2/DMF gelöst und bei 0°C mit DCC (9.6 mmol, 3 Äq.) versetzt. Nach 15-30 min bei 0°C wird vom Harnstoff direkt in den Reaktor abfiltriert, und wie in Tab. F.1 beschrieben weiterverfahren.

2.3. Kupplung von Asn und Glu

Fmoc-Asn-OH bzw. Fmoc-Gln-OH (9.6 mmol, 3 Äq.) werden in 20-30 ml DMF gelöst und bei 0°C mit HOBt (19.2 mmol) versetzt. Nach 15 min bei 0°C wird vom Harnstoff direkt in den Reaktor zum Harz abfiltriert. Reaktionsdauer: 4-5 h.

2.4. Abspaltung des N_α-Fmoc-geschützten bzw. freien Peptids vom Polymer

Am Ende des Synthesezyklus wird die geschützte Peptid-Polymerharz-Verbindung (ca. 5 g) gut mit CH_2Cl_2 gewaschen,

Tab. F.1: Der Sequenzaufbau eines Peptids mit symmetrischen N_α-Fmoc-Aminosäureanhydriden.

Operation	Reagenz[a]	Zeit [min]	Häufigkeit
1	CH_2Cl_2	2	2
2	DMF	2	2
3	55 % Piperidin/DMF (v/v)	5	1
4	55 % Piperidin/DMF (v/v)	10	1
5	DMF	2	3
6	Isopropanol	5	2
7	DMF	2	3
8	CH_2Cl_2	2	3
9	DMF	2	2
10[b,c]	Kupplung mit 3 Äq. symmetr. Fmoc-Aminosäureanhydrid in DMF/CH_2Cl_2 1:1 (v/v); nach 15 min Zugabe von 3 Äq. NMM	90	1
11	DMF	2	3
12	CH_2Cl_2	2	3
13	Überprüfung der Vollständigkeit d. Kupplung mittels Kaiser-Test [23,192]; wenn notwendig Schritte 10-12 wiederholen		
14	Acetylieren: 2 Äq. Ac_2O und 0.5 Äq. NMM in 20 ml CH_2Cl_2	15	1
15	CH_2Cl_2	2	3
16	Isopropanol	2	3
17	CH_2Cl_2	2	3

[a] Waschvolumina betragen für 5 g Harz ca. 25-30 ml

[b] Asn und Glu werden mittels DCC/HOBt gekoppelt

[c] Soll das Peptid nach Abspaltung vom Harz frei vorliegen, wird im letzten Kupplungsschritt Boc-geschützte Aminosäure eingesetzt.

im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet, und dann 2.5 h mit einer Mischung aus 30 ml 55 % TFE/CH_2Cl_2, 5 ml Anisol und 0.3 ml Dithioethan geschüttelt. Man filtriert ab, wäscht mit 30-50 ml CH_2Cl_2, engt i. Vak. ein, nimmt den Rückstand in 10-15 ml Eisessig auf, bzw. tropft sofort in 200 ml kalten Ether ein. Das ausgefallene farblose Peptid wird abzentrifugiert, mehrmals mit Ether gewaschen und getrocknet.

2.5. H-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-OH x 2 HCl (α-IFn-5)

Sequenzaufbau durch Kupplung der symmetrischen Anhydride Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Boc-Ala-OH an entacyliertes Fmoc-Arg(H^+)-R, (Arg-Guanidinofunktion wird durch Protonierung geschützt).
Änderung des Synthesezyklus wegen Protonierung der Guanidinogruppe des Arginins (vgl. Tab. F.1):

9	DMF	2 x 2 min
9a	Protonierung der Guanidino-Arg und N_α-Gruppe mit 3 Äq. Pyridinhydrochlorid in CH_2Cl_2	1 x 15 min
9b	CH_2Cl_2	1 x 2 min
9c	Deprotonierung der N_α-Funktion mit 3 Äq. NMM in CH_2Cl_2/DMF 1:1 (v/v)	1 x 5 min
9d	DMF	2 x 2 min
9e	CH_2Cl_2	2 x 2 min
10	Kupplung	1 x 90 min

Anfangsbeladung: 0.19 mmol Fmoc-Arg(H^+) pro g Harz
Endbeladung: 0.17 mmol Pentapeptid pro g Harz
Abspaltung: analog allg. Vorschrift F. 2.4.
Rohausbeute: 528 mg α-IFN-5 (146-150) x 2 TFE (74.6 % bzgl. Endbeladung)

Reinheit: Neben dem Hauptprodukt R_F (VI) = 0.38 sind zu etwa 10 % 2 hydrophile Verunreinigungen vorhanden mit R_F (VI) = 0.27 und R_F (VI) = 0.15

Elektrophorese:

Hauptspot: $R_{DNP-Lys}$ = 1.42 [2 % NH_4Ac/AcOH (pH 5.2). 1000 V, 55 mA bei 50 min; Cellulose-Platten]

Nebenspots: $R_{DNP-Lys}$ = 1.17 und 1.72; Bedingungen dto.

Überführung von α-IFN-5 x 2 TFE in α-IFN-5 x 2 HCl

96 mg Rohprodukt α-IFN-5 x 2 TFE in 10 ml dest. H_2O wird mit 2 g DOWEX 1 X 4 Ionenaustauscher (Cl^--Form) behandelt; nach 15 min wird abgesaugt, mit 2 x 5 ml dest. H_2O nachgespült und lyophilisiert.
Ausbeute: 70 mg (89.4 %)

Säulenchromatographie:
60 mg Rohprodukt α-IFN-5 (146-150) x 2 HCl werden über Verteilungschromatographie im Zweiphasensystem n-Butanol/AcOH/H_2O (4:1:5) an Sephadex G-10 gereinigt (Säule 1 cm x 75 cm, Flußrate 0.8 ml/min, Niederdrucksystem mit CFG-Membranpumpe, 1 bar). Säule wird zuerst mit Unterphase äquilibriert und mit dem 1.5-fachen Bettvolumen Oberphase gespült. Die Substanz wird in Oberphase gelöst aufgegeben und mit dieser eluiert. Es werden Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Detektion mittels DC-System VI. Fraktionen 36-47 enthalten 25 mg reines Pentapeptid.
Schmp.: > 200°C; löslich in H_2O, DMF; unlöslich in MeOH
R_F (VI) = 0.38; R_F (VIII) = 0.3; $[\alpha]_D^{20}$ = -53.2° (c = 0.1, H_2O).

$C_{24}H_{46}N_8Cl_2SO_8$ (677.64)

ber	C	42.54	H	6.79	N	16.54
gef	C	41.63	H	6.01	N	17.38

Aminosäurenanalyse

	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Peptidgehalt
Rohpeptid	1.13	1.02	1.0	1.03	0.81	87.5 %
gereinigtes Peptid	1.05	0.99	1.0	1.02	0.96	96.2 %

D,L-Bestimmung: D-Ala 0.1 %, D-Met 0.1 %
D-Ile 0.02 %, D-Arg 0.06 %
D-Glu 0.4 %

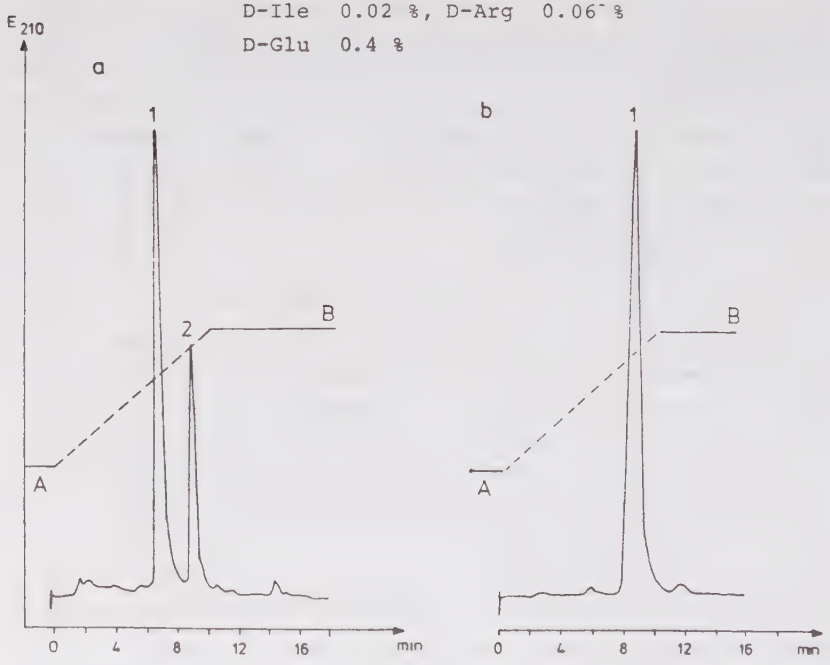


Abb. F.1: HPLC-Chromatogramm von
a) α-IFN-5 (Rohprodukt nach Abspaltung vom Harz)
b) α-IFN-5 (nach verteilungschromatographischer Reinigung an G-10 im Zweiphasensystem n-Butanol/ Eisessig/H_2O 4:1:5)

Säule: Lichrosorb-NH_2
Mobile Phase: A = CH_3CN/0.01 mol KH_2PO_4 500:70 (v/v)
B = 0.01 mol KH_2PO_4; Gradient 25 % B nach 65 % B
Fließgeschwindigkeit: 2 ml/min.

2.6. H-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-OH x HCl (γ-IFN-5)

Sequenzaufbau durch Kupplung der symmetr. Aminosäureanhydride von Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Boc-Phe-OH an entacyliertes Fmoc-Asn- R .
Fmoc-Asn-OH wird mittels DCC/HOBt gekoppelt.
Ansatzgröße: 5 g Fmoc-Asn- R
Anfangsbeladung: 0.29 mmol Fmoc-Asn / g Harz
Endbeladung: 0.21 mmol Pentapeptid

In Abänderung der allg. Vorschrift (vgl. Kap. F.2.2.) wurde Fmoc-Asn-OH als 1. Aminosäure ebenfalls mittels DCC/HOBt in 3-fachem Überschuß (bzgl. der Harzbeladung von 0.64 mmol OH-Gruppen/g Harz) über Nacht gekuppelt (vgl. Kap. F.3).
Abspaltung vom Harz:
Analog allg. Vorschrift F. 2.4. Abspaltungsdauer jedoch nur 1.5 h um Nebenreaktionen am Asn zu unterdrücken.

Rohausbeute: 280 mg Pentapepid (35 % bzgl. der Endbeladung).
Reinheit:
Hauptprodukt R_F (VI)) 0.48; lipophilere Nebenprodukte mit R_F (VI) = 0.5 und R_F (VI) = 0.52 (vgl. HPLC-Chromatogramm Abb. F.2). Von den aufgeführten DC-Systemen sind alle Nebenspots nur in System VI aufgelöst.

Elektrophorese:
R_{Lys} = 1.13 [0.05 mol K_2CO_3 (pH = 10.5); 800 V, 10 mA, 30 min, Cellulose-Platten]
R_{Lys} = 0.36 [0.2 mol Pyridin/AcOH (pH = 3); 600 V, 30 mA; 50 min, Cellulose-Platten]

Säulenchromatographische Reinigung

32 mg verunreinigtes γ-IFN (84-88) werden an Sephadex G-10 (Säule 1 cm x 90 cm) mit 0.1 mol NH_4Ac/NH_3 (pH = 8) chromatographiert. Detektion mittels DC (System VI). Die Fraktionen werden mit 0.1 N HCl auf pH 2 gestellt und lyophilisiert.
Ausbeute: 25 mg Pentapeptid, in welchem die lipophilen Verunreinigungen nur teilweise abgetrennt sind (vgl. HPLC-Chromatogramm Abb. F.2).

Das Peptid ist schwerlöslich in H_2O, DMF und AcOH; löslich in schwachen Basen (pH $\geq$ 8) und in DMSO.

γ-IFN-5 x HCl: $C_{29}H_{37}N_7O_9Cl$ (663.1), Schmp. > 200°C
R_F (VI) = 0.48; R_F (I) = 0.31; R_F (III) = 0.6

Aminosäurenanalyse

	Phe(2)	Asn(2)	Ser(1)	Peptidgehalt
Rohprodukt	2.0	1.89	0.88	83 %
chromatographiertes Produkt	2.0	1.94	0.92	95 %
Peak 1 (Abb. F.2)	2.0	1.98	0.98	
Peak 2 (Abb. F.2)	2.0	2.01	0.97	

Enzymatischer Abbau von γ-IFN-5 mit Carboxypeptidase A

Der enzymatische Abbau wurde nach literaturbekannten Verfahren [193,194] mit Carboxypeptidase A (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Die Enzym/Peptidverhältnisse betrugen 2:1; 1:1; 1:10; 1:20 und 1:100. Die Abbaureaktion wurde bei 37°C in einem 0.05 mol NMM/AcOH-Puffer bei pH = 8 durchgeführt. Die Spaltung wurde dünnschichtchromatographisch in System VI nach 2, 4, 6 und 8 h verfolgt.

Bei einem Enzym-Substratverhältnis von 2:1 waren sämtliche 3 Spots des gereinigten Rohprodukts nach 2 h verschwunden,

bei einem Enzym-Substratverhältnis von 1:100 dauerte der vollständige Abbau 8 h.

Das Enzym wird durch Ansäuern mit 0.1 N HCl auf pH = 2 ausgefällt, abzentrifugiert, und der Überstand direkt zur Aminosäurenanalyse gegeben. Ein Teil des Überstandes wird 24 h bei 110°C mit 6 N HCl hydrolysiert.

Aminosäurenanalyse

	Phe(2)	Asn(2)	Ser(1)
6 N HCl/24 h	2.0	1.94	0.92
Carboxypeptidase A	2.0	0.1	0.93
Hydrolyse des Überstandes mit 6 N HCl	2.0	1.96	0.90

D,L-Bestimmung: D-Phe 0.1 %, D-Asn 0.3 %, D-Ser 0.04 %

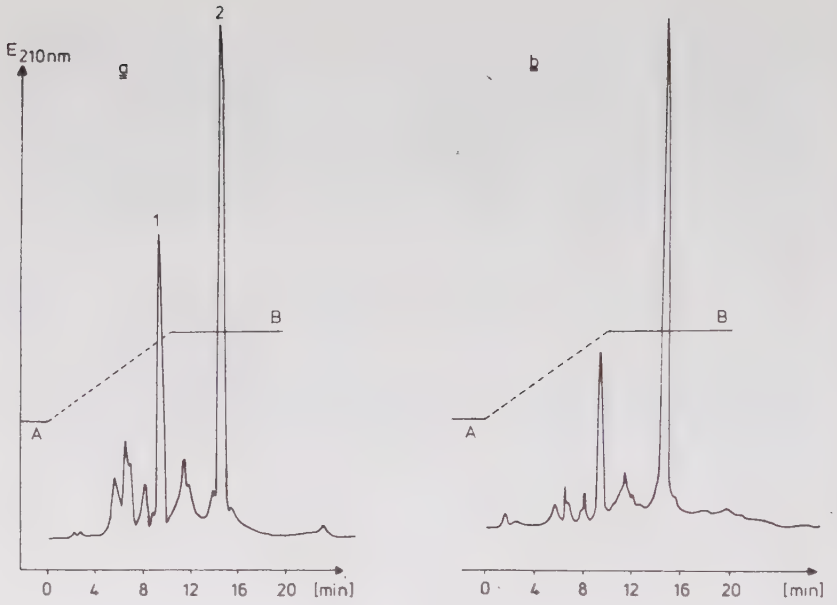


Abb. F.2: HPLC-Chromatogramm von
a) γ-IFN-5 (Rohprodukt)
b) γ-IFN-5 (an Sephadex G-15 gereinigt)
Säule: Lichrosorb-NH_2
Mobile Phase: A: CH_3CN/H_2O 500:70 (v:v)
B: 0.01 mol KH_2PO_4
Gradient: 0-20 % B

2.7. H-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu-Tyr-Val-OH x 3 HCl
(NC-9)

Sequenzaufbau durch Kupplung der symmetrischen Fmoc-Aminosäureanhydride von Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH (3x), Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH an entacyliertes Fmoc-Val-R wie in Tab. F.1 dargestellt.

Ansatzgröße: 5 g Fmoc-Val-R
Anfangsbeladung: 0.52 mmol Fmoc-Val / g Harz
Endbeladung: 0.34 mmol Nonapeptid
Restbeladung nach Abspaltung: 0.025 mmol Peptid / g Harz
Abspaltung: Analog der allg. Vorschrift F. 2.4. als Fmoc-NC-9 x 2 TFE
Rohausbeute: 3.17 g Fmoc-NC-9-OH x 2 TFE (82 %)
Reinheit: Hauptprodukt R_F (VI) = 0.63 enthält lediglich eine hydrophile Verunreinigung R_F (VI) = 0.51 von max. 2-3 %

Säulenchromatographische Reinigung

230 mg Rohprodukt Fmoc-NC-9 x 2 TFE werden an Sephadex-LH-20 (Säule 3.5 x 75 cm) mit $CHCl_3$/MeOH (1:1, v/v) eluiert, Fließgeschwindigkeit 1.4 ml/min. Die Fraktionen (à 4 ml) 34-46 enthalten 200 mg Nonapeptid, welches in 4 DC-Systemen einheitlich ist.

Überführung von Fmoc-NC-9 x 2 TFE in Fmoc-NC-9 x 2 HCl

225 mg gereinigtes Fmoc-NC-9 x 2 TFE wird in 10 ml MeOH/H_2O 4:1 (v/v) 15 min mit 2 g DOWEX 1X4 (Cl^--Form) behandelt, vom Harz abgesaugt, nachgewaschen und das Lösungsmittel i. Vak. verdampft.

Ausbeute: 160 mg Fmoc-NC-9 x 2 HCl; Schmp. $> 200^oC$; löslich in MeOH, DMF; unlöslich in H_2O
R_F (VI) = 0.63, R_F (IV) = 0.08, R_F (III) = 0.58, R_F (I) = 0.2; $[\alpha]_D^{20} = -70^o$ (c = 0.2; MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -52.5^o$ (c = 0.2; DMF).

$C_{70}H_{107}N_{11}O_{15}Cl_2$ (1413,58)

ber.	C	59.48	H	7.57	N 10.90
gef.	C	60.30	H	6.91	N 12.01

H-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu-Tyr-Val-OH x 3 HCl (H-NC-9 x 3 HCl)

233 mg Fmoc-NC-9 x 2 TFE (Rohprodukt) werden mit 55 % Piperidin/DMF (5 ml) gerührt. Nach 20 min wird die leicht trübe Lösung im Hochvakuum eingedampft, mehrmals mit Ether gewaschen, abzentrifugiert und getrocknet. Das Rohprodukt (212 mg) wird in verd. HCl (pH = 2) gelöst und an Sephadex G-15 (Säule 3 x 90 cm) mit 0.1 N Essigsäure eluiert. Reine Fraktionen (Detektion in DC-System VI) werden gesammelt und lyophilisiert.

Ausbeute: 195 mg; Schmp. $>200^{\circ}C$; löslich in schwachen Säuren und Basen und DMSO

R_F (VI) = 0.7, R_F (VII) = 0.4; $[\alpha]_D^{20} = -76^{\circ}$ (c = 0.25, 50 % Essigsäure).

D,L-Bestimmung: D-Lys 0.01 %; D-Leu 0.01 %;
D-Tyr 0.013 %; D-Glu 0.02 %;
D-Val 0.009 %.

Aminosäurenanalyse: vgl. Tab. F.2.

$C_{55}H_{98}N_{11}O_{13}Cl_3$ (1227.68)

ber.	C	53.78	H	7.98	N 12.55
gef.	C	53.02	H	6.98	N 11.81

Tab. F.2: Aminosäurenanalysen während des Syntheseverlaufs von NC-9

Syntheseschritt	Beladung (mmol/g)	Val	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu
1	0.52	(1)								
2	0.42	1	0.94							
3	0.41	1	0.96	0.98						
4	0.39	1	0.97	0.99	0.89					
5	0.39	1	0.96	0.97	0.97	0.96				
6	0.37	1	1	0.99	0.95	0.96	0.96			
7	0.36	1	0.99	.98	0.96	0.97	0.97	0.97		
8	0.35	1	0.96	1.01	0.96	0.98	0.98	0.98	0.96	
9	0.34	1	.97	1.04	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96
gereinigtes Fmoc-NC-9 x 2 HCl		1.02	0.96	1.04	0.98	1	1	1	0.98	1
gereinigtes NC-9 x 3 HCl		1.05	0.98	1.01	0.96	1	1	1	0.96	1

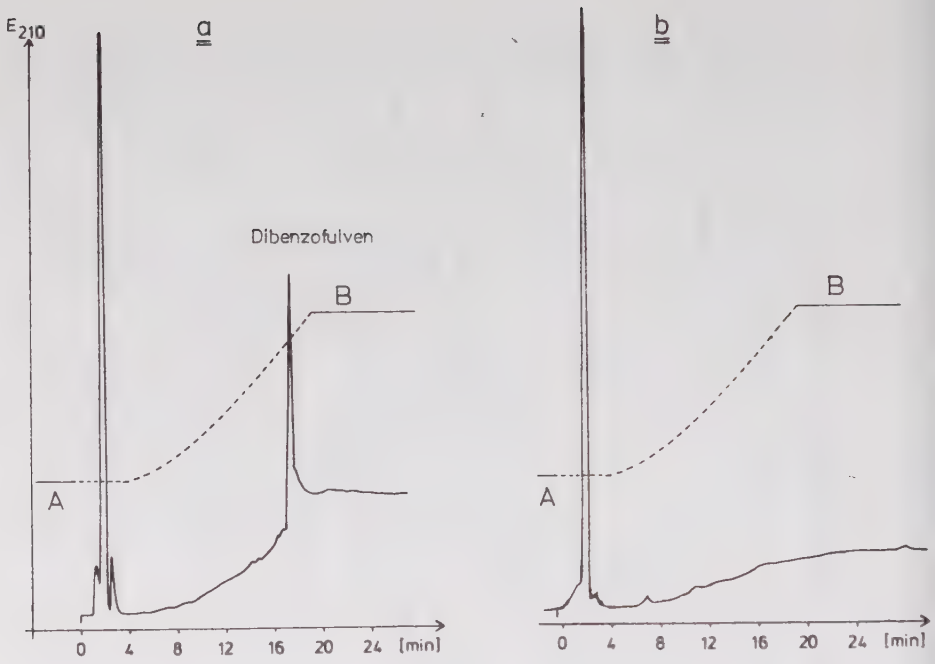


Abb. F.3: HPLC-Chromatogramm von
a) NC-9 (Rohprodukt)
b) NC-9 (an G-15 gereinigt)
Säule: Hypersil ODS
Mobile Phase: A: 90 % KH_2PO_4, 10 % CH_3CN (v/v)
B: 100 % CH_3CN
Gradient: A-B (20 min)

N_α-Fmoc-Leu-Lys(Fmoc)-Leu-Leu-Leu-Lys(Fmoc)-Glu-Tyr-Val-OH
(N_α, N_ε, $N_{\varepsilon'}$-Fmoc-NC-9)

Fmoc-NC-9 x 2 HCl (50 mg, 35.7 µmol) in 3 ml DMF, Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl, 92 mg, 357 µmol), d.h.

10 molarer Überschuß, und NMM 840 µl, 357 µmol) werden 24 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Ansäuern mit 1 N HCl auf pH 3 wird Lösungsmittel i. Vak. verdampft und Produkt an LH-20-Sephadex-Säule (3 x 90 cm) mit $CHCl_3$/MeOH 1:1 (v/v) eluiert. Ausbeute: 57 mg. Das Produkt besteht zu etwa 80-90 % aus Tri-Fmoc-NC-9 [R_F (I) = 0.78], ca. 10-15 % Di-Fmoc-NC-9, [R_F (I) = 0.51] und 5-10 % Fmoc-NC-9 [R_F (I) = 0.2].

2.8. H-Ala-Glu-Thr-Asn-Arg-Ala-Pro-Phe-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Glu-OH x 2 HCl (NC-14 x 2 HCl)

Sequenzaufbau durch Kupplung der symmetrischen Fmoc-Aminosäureanhydride Boc-Ala-OH bzw. Fmoc-Ala-OH (für HSc-NC-14) Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Arg(N^g-Mtr)-OH [195], Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asp-(OtBu), Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH an Fmoc-Glu(OtBu)- R wie in Tabelle F.3 dargestellt. Fmoc-Arg(N^g-Mtr)-Anhydrid wird 18 h gekuppelt, Fmoc-Asn-OH wird mit DCC/HOBt 5 h gekuppelt.

Ansatzgröße: 3 g Fmoc-Glu(OtBu)-R
Anfangsbeladung: 0.42 mmol Fmoc-Glu(OtBu) / g Harz
Endbeladung: 0.36 mmol Tetradekapeptid / g Harz
Restbeladung: 0.015 mmol Peptid

Ala^{14} wird einmal als Boc-Ala-Anhydrid an ca. 1.8 g H-NC-13- R gekuppelt, zum anderen als Fmoc-Ala-Anhydrid an ca. 2.3 g H-NC-13- R gekuppelt.

Abspaltung: 2.5 g Boc-Ala-NC-13- R wird zur Peptidabspaltung 3 h mit 20 ml TFE und 1 ml Thioanisol geschüttelt.

Ausbeute: 0.81 g NC-14 x 2 TFE (94 %)

Reinheit: Das Rohprodukt NC-14 x 2 TFE zeigt im DC-System III 4 Spots (2 Doppelspots) unterschiedlicher Intensität (vgl. Abb. F.4).

Spot 1 und 2 machen die Hauptmenge aus (90 %) und sind laut ASA identisch; Spots 3 und 4 können durch säulenchromatographische Reinigung an G-15 abgetrennt werden.

Bedingungen:
Säule: 3 x 90 cm; Eluent: 0.1 mol Essigsäure; Fließgeschwindigkeit 0.8 ml/min; Aufgabemenge 180 mg; Fraktionen 48-66 (à 4 ml) enthalten 100 mg Peptid, welches in System III als Doppelspot erscheint.

H-NC-14 x 2 HCl

H-NC-14 x 2 TFE (100 mg, 56.8 µmol) werden in 5 ml MeOH/H_2O 1:1 mit DOWEX 1^X4 (Cl^--Form) behandelt. Nach 15 min wird abgesaugt, gewaschen und das Lösungsmittel i.Vak. eingedampft. Ausbeute: 78 mg (86 %) H-NC-14 x 2 HCl; löslich in 50 % MeOH, 50 % Essigsäure, DMF.
$C_{65}H_{100}O_{25}N_{18}$ x 2 HCl (1606,53); Schmp. $> 200^{\circ}C$; R_F (III) = 0.05 und 0.11; R_F (VI) = 0.3 und 0.36; R_F (IX) = 0.77.

Elektrophorese: R_{Glu} = 0.35 und 0.42 [5 % $KHCO_3$ (pH 8); 600 V, 80 mA, 60 min, Cellulose]; Hauptprodukt ($\geq$ 90 %): R_{Glu} = 0.35.

Bei der Elektrophorese des Rohprodukts NC-14 x 2 HCl fallen die zwei Doppelspots zu zwei einfachen Spots zusammen. Die Verunreinigung (R_{Glu} = 0.42) rührt wahrscheinlich von NC-14-(Arg^{10}-N^G-Mtr) x HCl her.

D,L-Bestimmung:	D-Ala	0.07 %;	D-Thr	0.01 %;
	D-Pro	0.018 %;	D-Leu	0.01 %;
	D-Asn	0.015 %;	D-Phe	0.06 %;
	D-Glu	0.01 %;	D-Arg	0.13 %.

III

Aminosäurenanalysen:

Spots 1,2: Glu 3.0(3.0);
Arg 0.96(1); Phe 1.05(1);
Asx 1.96(2); Pro 1.06(1);
Ala 3.6(4); Thr 1.03(1).

Spots 3,4: Glu 3.0;
Arg 0.65(1); Phe 1.04(1);
Asx 1.98(2); Pro 1.1(1);
Ala 3.56(4); Thr 1.07(1).

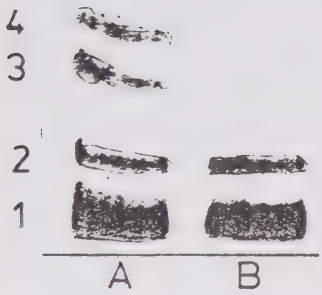


Abb. F.4: DC-Chromatogramm in DC-System III

A: Rohprodukt H-NC-14-OH x 2 HCl

B: an Sephadex G-15, 0.1 N Essigsäure gereinigtes H-NC-14-OH x 2 HCl

HSc-Ala-Glu-Thr-Asn-Arg-Ala-Pro-Phe-Asp-Leu-Ala-Glu-Ala-Glu-OH x 2 TFE (HSc-NC-14 x 2 TFE)

2.3 g Fmoc-Ala-NC-13- R wird mit 55 % Piperidin/DMF entacyliert und analog der Vorschrift F.5.1 mit Boc-HSc-OH (3 g, 12.93 mmol; 16 Äq.) 4-5 h mittels DCC/HOBt in 20 ml DMF/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) gekuppelt.

Abspaltung: 3 h mit 20 ml TFE/Thioanisol (5 %, v/v)
Ausbeute: 1.02 g (92 %) HSc-NC-14-OH x 2 TFE
$C_{73}H_{107}O_{27}N_{20}F_6$ (1810.76); löslich in H_2O, DMF, Essigsäure, wenig löslich in MeOH.

Reinheit: Analog zu NC-14 x 2 TFE erscheinen im DC-System VI 4 Spots (2 Doppelspots), welche durch Besprühen mit Barton's Reagenz [189], die für freie Hydrazide charakteristische blaue Fleckenfärbung geben.
Hauptprodukt (90 %): R_F (VI) = 0.38 und 0.41; R_F (II) = 0.1 und 0.17.

Aminosäurenanalyse: Glu 3.0(3); Thr 0.99(1); Phe 1.07(1); Leu 1.05(1); Arg 1.05(1); Asx 2.06(2); Ala 3.6(4); Pro 1.03(1).

Auf Grund der Instabilität der Rohhydrazide [196] wurde HSc-NC-14-OH x 2 TFE sofort mittels Azidkupplung an HSA gekuppelt (vgl. F. 4.4.).

3. Peptidsynthesen nach der klassischen Methode

Die zur Synthese verwendeten Boc, Z-geschützten Aminosäuren wurden nach literaturbekannten Methoden synthetisiert; Boc-Pro-OH, Boc-Val-OH wurde nach Moroder et al. [197] mittels Di-tert-butyldicarbonat (Fluka) dargestellt.

Kupplungen wurden nach der DCC/HOBt-Methode [133] bzw.

nach der Mixed-Anhydrid-Methode [198] mit Chlorameisensäureisobutylester durchgeführt.

3.1. Synthese von H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-OH x 2 HCl (γ-IFN-7)

Z-Phe-Lys(Boc)-OtBu

Z-Phe-OH (9 g, 30 mmol) und HOBt (4 g, 30 mmol; in möglichst wenig DMF gelöst zugeben) werden in CH_2Cl_2 bei 0°C mit DCC (6.2 g, 30 mmol) voraktiviert. Nach 15-20 min wird eine Lösung von H-Lys(Boc)-OtBu x HCl (10 g, 30 mmol) mit NMM (3.32 ml, 30 mmol) in möglichst wenig DMF zugegeben und 14 h bei Raumtemp. gerührt. Der ausgefallene DCH wird abgesaugt, das Lösungsmittel anschließend im Hochvakuum entfernt. Der ölige Rückstand wird in EE aufgenommen, ein weiteres Mal von DCH abgesaugt, und die organische Phase je dreimal mit 5 % $KHCO_3$ und 5 % $KHSO_4$ gewaschen. Zuletzt wird mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet. Das dünnschichtchromatographisch reine Dipeptid kristallisiert aus EE durch Zugabe von PE 30/50.

Ausbeute: 14.14 g (81 %)

Schmp. 98°C (EE/PE); $[\alpha]_D^{20} = -16^o$ (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1). R_F (VI) = 0.87; R_F (II) = 0.82; R_F (VII) = 0.88.

$C_{32}H_{45}N_3O_7$ (583.73)

ber.	C	65.84	H	7.77	N 7.19
gef.	C	65.92	H	7.10	N 8.02

H-Phe-Lys(Boc)-OtBu x HCl

Z-Phe-Lys(Boc)-OtBu (13.9 g, 23.8 mmol) wird in MeOH unter Zusatz von Pd/C 3 h im H_2-Durchflußstrom hydriert.

Nach Abfiltrieren des Katalysators wird mit 1 N HCl/Diisopropylether auf pH 4 gestellt und das Lösungsmittel im Hochvakuum vollständig entfernt. Das ölige DC-reine Dipeptidhydrochlorid wird sofort zur Kupplung zum Tripeptid eingesetzt.
Ausbeute: 10.3 g (89 %); $C_{24}H_{39}N_3O_5$ x HCl (485.5);
R_F (X) = 0.55.

Z-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu

Z-Tyr(tBu)-OH (8 g, 21.5 mmol) wird wie bereits beschrieben mittels DCC/HOBt an H-Phe-Lys(Boc)-OtBu x HCl (10 g, 20.5 mmol) in DMF/CH_2Cl_2 1:1 (v/v) gekuppelt. Nach der üblichen Aufarbeitung wird das Rohprodukt in 15 ml MeOH/EE 2:1 (v/v) aufgenommen, und das Tripeptid durch langsame Zugabe von Ether, gefolgt von PE 30/50 gallertartig ausgefällt.
Ausbeute: 11.5 g (70 %); Schmp.: 107°C (MeOH/EE/Ether);
$[\alpha]_D^{20}$ = -22.3° (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1).
R_F (VII) = 0.88; R_F (VI) = 0.86; R_F (V) = 0.82.

$C_{45}H_{62}N_4O_9$ (803.01)

ber.	C	67.33	H	7.73	N 6.98
gef.	C	68.41	H	7.35	N 7.71.

H-Tyr(tBu)-Phe-lys(Boc)-OtBu x HCl

Z-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu (11.1 g, 13.9 mmol) in MeOH (100 ml) wird mit Pd/C (0.7 g) 2 h bei Raumtemp. im H_2-Durchflußstrom hydriert. Das Pd/C wird abfiltriert, und das Filtrat mit 1 N HCl/Diisopropylether auf pH 4 gebracht und das Lösungsmittel i.Vak. verdampft. Der Rückstand wird aus MeOH/Ether kristallisiert.
Ausbeute: 8.2 g (84 %);

Schmp.: 59°C (MeOH/Ether); $[\alpha]_D^{20}$ = -19.9° (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1); R_F (I) = 0.78; R_F (IV) = 0.84; R_F (V) = 0.58; R_F (II) = 0.56; R_F (VI) = 0.73.

Aminosäurenanalyse: Tyr 0.98(1); Phe 1.00(1); Lys 1.02(1).

$C_{37}H_{56}N_4O_7$ x HCl (704.5)

ber.	C	63.02	H	8.09	N 7.94
gef.	C	62.20	H	8.79	N 7.11

Boc-Ser(Bzl)-Phe-OMe

Boc-Ser(Bzl)-OH (16.9 g, 57.2 mmol) wird wie zu Anfang beschrieben mittels DCC/HOBt an H-Phe-OMe x HCl (12 g, 55.8 mmol) in DMF gekuppelt. Nach 14 h wird wie üblich aufgearbeitet und das Dipeptid aus EE/PE kristallisiert.
Ausbeute: 17.6 g (66.4 %);
Schmp.: 108°C (EE/PE); $[\alpha]_D^{20}$) +20.3 (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1); R_F (I) = 0.91; R_F (V) = 0.78; R_F (II) = 0.8.

$C_{25}H_{32}N_2O_6$ (456.48)

ber.	C	65.78	H	7.01	N 6.14
gef.	C	65.10	H	7.60	N 6.35

H-Ser(Bzl)-Phe-OMe x HCl

Boc-Ser(Bzl)-Phe-OMe (17.2 g, 37.7 mmol) wird in 30 ml 1.2 N HCl/Eisessig 30 min gerührt. Die Lösung wird im Hochvakuum eingeengt und das Hydrochlorid durch Eintropfen in Ether ausgefällt.
Ausbeute: 13.4 g (91 %); $C_{20}H_{24}N_2O_4$ x HCl (392.5); R_F (XI) = 0.68.

Boc-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe

Boc-Val-OH (8 g, 36.8 mmol) wird wie beschrieben mittels DCC/HOBt mit H-Ser(Bzl)-Phe-OMe x HCl (14.7 g, 35.6 mmol) in CH_2Cl_2/DMF 14 h gekuppelt. Nach üblicher Aufarbeitung wird aus EE/Diisopropylether kristallisiert.
Ausbeute: 12.3 g (62 %);
Schmp.: 125°C; $[\alpha]_D^{20}$ = +3.5° (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1);
R_F (V) = 0.74; R_F (I) = 0.91; R_F (II) = 0.81.

$C_{30}H_{41}N_3O_7$ (555.67)

ber.	C	64.86	H	7.38	N 7.56
gef.	C	64.02	H	7.00	N 7.1

H-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe x HCl

Boc-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe (12 g, 21.6 mmol) wird mit 40 ml 1.2 N HCl/Eisessig übergossen. Nach ca. 20 min erstarrt die Lösung zu einer farblosen Masse. Nach Aufschlämmen in Ether wird abgesaugt, mehrmals mit Ether nachgespült und getrocknet.
Ausbeute: 10.2 g (96 %);
Schmp.: 203°C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$ = -35.3° (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1); R_F (I) = 0.68; R_F (II) = 0.26; R_F (III) = 0.68;
R_F (VI) = 0.78.
$C_{25}H_{33}N_3O_5$ x HCl (491.5)

ber.	C	61.03	H	6.71	N 8.54
gef.	C	60.11	H	6.45	N 7.93

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe

Z-Ile-OH (5.5 g, 20.7 mmol) wird wie beschrieben mittels DCC/HOBt mit H-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe x HCl (10 g, 20.3 mmol) in DMF 14 h gekuppelt. Ein Teil des Peptids fällt dabei

zusammen mit DCH aus. Nach Absaugen und Waschen des DCH mit MeOH/DMF (1:1) wird die Lösung i.Vak. eingedampft und der in reichlich CH_2Cl_2 gelöste Rückstand mit 5 % K_2CO_3 und 5 % $KHSO_4$ je dreimal gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$ fällt das Tetrapeptid durch Zusatz von Diisopropylether gallertartig aus. Das Peptid enthält noch Spuren an DCH.

Ausbeute: 10.5 g (72 %);

Schmp.: $>210^{\circ}C$; R_F (II) = 0.84; R_F (V) = 0.8;

$C_{39}H_{50}N_4O_8$ (702.77)

ber.	C	66.66	H	7.12	N 7.97
gef.	C	67.98	H	7.60	N 8.75

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OH

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OMe (10.4 g, 14.8 mmol) in 40 ml MeOH wird durch Zugabe von 25 ml 0.5 N NaOH bei pH 10-11 während 1 h verseift. Nach Verdampfen des MeOH i.Vak. wird mit verd. HCl auf pH 9 gestellt und dreimal mit 50 ml EE extrahiert. Die wässrige Phase wird mit verd. HCl auf pH 2-3 gebracht und das Tetrapeptid mit EE (3 x 50 ml) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird die Peptidsäure durch Zugabe von Ether/PE 1:1 (v/v) ausgefällt.

Ausbeute: 4 g (40 %);

Schmp.: $210^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{20} = +1.2^{\circ}$ (c =1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1);

R_F (I) = 0.91; R_F (II) = 0.8; R_F (V) = 0.77;

Aminosäurenanalyse: Ile 1.00(1); Val 1.03(1); Ser 0.96(1); Phe 0.98(1)

$C_{38}H_{48}N_4O_8$ (688.82).

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-OH (3.7 g, 5.37 mmol) wird wie zu Beginn beschrieben mittels DCC/HOBt an H-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu x HCl (3.17 g, 6.44 mmol) in DMF/CH_2Cl_2 (1:1) 14 h gekuppelt. Nach der üblichen Aufarbeitung wird das vollgeschützte Heptapeptid aus der getrockneten EE-Phase durch Zugabe von Diisopropylether ausgefällt.
Ausbeute: 6.22 g (87 %).

Kleine Verunreinigungen von DCH und Tripeptid (4-5 %) werden säulenchromatographisch an Sephadex LH-20 abgetrennt [Säule: 3.4 x 75 cm; Eluent: $CHCl_3$/MeOH (1:1); Fließgeschwindigkeit 1.5 ml/min; Fraktionen à 4 ml; Aufgabenmenge: 225 mg; DC-reine Fraktionen (Nr. 52-62) in II: 190 mg].
Schmp.: $>200^{\circ}C$; $[\alpha]_D^{20} = -35^{\circ}$ (c = 1 in $CHCl_3$/MeOH 1:1);
R_F (I) = 0.93; R_F (II) = 0.78; R_F (VI) = 0.73.
$C_{75}H_{102}N_8O_{14}$ (1339.68)

ber.	C	67.24	H	7.67	N 8.36
gef.	C	66.25	H	6.98	N 8.11

H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu x HCl

Z-Ile-Val-Ser(Bzl)-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu (140 mg, 0.1 mmol) wird in 12.5 ml Eisessig/MeOH/H_2O (5:1:0.5) 10 h mit Pd/C im H_2-Durchflußstrom hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird mit verd. HCl auf pH 3.8 gestellt, das Lösungsmittel i.Vak. verdampft und der ölige Rückstand in Ether gerührt.
Ausbeute: 110 mg (96 %); Schmp.: $>200^{\circ}C$.

Das Heptapeptid enthält noch Spuren der Aminokomponente, welche an Sephadex LH-20 [Säule 3.4 x 75 cm] abgetrennt wird: Eluent $CHCl_3$/MeOH (1:1), Fließgeschwindigkeit

1.5 ml/min, Fraktion à 4 ml; Aufgabenmenge: 110 mg; DC-reine Fraktionen (Nr. 55-64) in I: 80 mg.
R_F (I) = 0.78; R_F (II) = 0.93; R_F (XII) = 0.52;
$C_{60}H_{90}N_8O_{12}$ x HCl (1150.5)

ber.	C	62.60	H	7.82	N 9.73
gef.	C	61.71	H	6.98	N 9.23

H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-OH x 2 HCl (γ-IFN-7 x 2 HCl)

H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu x HCl (150 mg, 1.3 mmol) wird mit 3 ml TFE 1 h unter Luftfeuchtigkeitsausschluß gerührt, TFE i.Vak. verdampft und der Rückstand mit Ether gerührt.
Ausbeute: 131 mg (89 %) γ-IFN-7 x 2 TFE.

γ-IFN-7 x 2 TFE (101 mg, 0.9 mmol) wird durch Rühren mit 1 g DOWEX 1X4 (Cl^--Form) in 6 ml DMF/H_2O (1:1) in γ-IFN-7 x 2 CHl übergeführt. Zuletzt wird aus DMF/Ether kristallisiert.
Ausbeute: 60 mg (69 %) γ-IFN-7 x 2 HCl
Schmp.: 210°C; $[\alpha]_D^{20}$ = -22.4° (c = 0.5 in 50 % AcOH);
$[\alpha]_D^{20}$ = -59° (c = 0.05 in 50 % DMF);
R_F (VI) = 0.54; R_F (IV) = 0.5; R_F (III) = 0.57;
Aminosäurenanalyse: Ile 0.97(1); Val 1.00(1); Ser 0.96(1); Phe 1.96(2); Tyr 0.98(1); Lys 1.05(1)

D,L-Bestimmung: D-Ile 0.004 %; D-Val 0.09 %;
D-Ser 0.013 %; D-Phe 0.01 %;
D-Tyr 0.013 %; D-Lys 0.01 %;

$C_{47}H_{65}N_8O_{10}$ x 2 HCl (974.99)

Boc-HSc-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-OtBu
(Boc-HSc-γ-IFN-7)

H-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-OtBu x HCl (80 mg, 69 µmol), N^h-tert. Butyloxycarbonyl-hydrazidbernsteinsäure (Boc-HSc-OH) (19 mg, 82 µmol), N-Hydroxysuccinimid (9.5 mg, 82 µmol) und NMM (7.7 µl, 69 µmol) werden in 4 ml DMF bei 0°C mit DCC (17 mg, 82 µmol) versetzt. Nach 14 h Rühren wird Lösungsmittel i.Vak. verdampft und der Rückstand an Sephadex LH-20 chromatographiert (Säule 3.4 x 75 cm; Eluent: $CHCl_3$/MeOH (1:1); Fraktionen à 4 ml). Die Fraktionen 48-60 ergeben 75 mg Produkt (81 %), Detektion mittels DC in II, Reinheit ≥ 96 % (DC):
R_F (I) = 0.34; R_F (II) = 0.61; R_F (XI) = 0.78
$C_{69}H_{105}N_{10}O_{16}$ (1330.65)

ber.	C	62.28	H	7.95	N 10.52
gef.	C	61.30	H	7.53	N 9.98

HSc-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-OH x 2 TFE

Boc-HSc-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr(tBu)-Phe-Lys(Boc)-OtBu (66 mg, 53 µmol) werden in 2 ml TFE/CH_2Cl_2 (1:1) während 3 h bei Raumtemp. unter Luftfeuchtigkeitsausschluß entschützt. Die Lösungsmittel werden i.Vak. verdampft und der Rückstand aus Ether gefällt.
Ausbeute: 54 mg (88 %) HSc-IFN-7 x 2 TFE;
Schmp.: >210°C; Reinheit: 95 % (DC); R_F (IV) = 0.27;
$C_{51}H_{69}N_{10}O_{12}$ x 2 TFE (1242,21)

Das freie Hydrazid (ca. 96 %) wird ohne weitere Reinigung mittels Azidkupplung an HSA gekuppelt (vgl. F. 4.4.).

3.2. Synthese der C-terminalen Sequenz H-Gly-Pro-Ala-Thr-OH (155-158) des Hüllproteins von TMV vulgare

Boc-Pro-Ala-OMe

Eisgekühlter Chlorameisensäureisobutylester (10.85 ml, 110 mmol) wird tropfenweise bei -20°C zu Boc-Pro-OH (23.65 g, 110 mmol) und NMM (12.2 ml, 110 mmol) in 45 ml DMF gegeben. Nach 15 min wird bei -15° bis -13°C eine vorgekühlte Lösung von HCl x H-Ala-OMe (13.5 g, 97 mmol) und NMM (10.85 ml, 97 mmol) in 50 ml DMF tropfenweise zugegeben. Nach weiteren 30 min bei -10°C, erwärmt sich die Mischung auf Raumtemp. Das Lösungsmittel wird i.Vak. verdampft und der ölige Rückstand in EE aufgenommen und mit 5 % $KHCO_3$, $KHSO_4$ und gesättigte NaCl-Lösung (je 3 x 50 ml) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 kristallisiert das Dipeptid aus der EE-Phase durch Zugabe von PE 30-50 in Form farbloser Prismen aus.

Ausbeute: 19.8 g (69 %);

Schmp.: 78°C; R_F (I) = 0.82; R_F (II) = 0.65; R_F (V) = 0.54;

$C_{14}H_{24}N_2O_5$ (300.35)

ber.	C	46.66	H	8.00	N 9.33
gef.	C	46.12	H	8.60	N 9.23

H-Ala-Pro-OMe x TFE

Boc-Pro-Ala-OMe (19.5 g, 65 mmol) wird in 150 ml TFE/CH_2Cl_2 (1:1) 15 min unter Luftfeuchtigkeitsausschluß gerührt. Nach Verdampfen der Lösungsmittel i.Vak. wird der Rückstand in EE aufgenommen und je 3 x mit 5 % $KHCO_3$ gewaschen.

Ausbeute: 12.1 g (93 %) öliges Produkt; R_F (I) = 0.61.

Der Dipeptidester wird sofort zur Kupplung eingesetzt.

Z-Gly-Pro-Ala-OMe

Bei 0°C wird DCC (11.7 g, 57 mmol) zu Z-Gly-OH (11.9 g, 57 mmol) und HOBt (8.8 g, 71 mmol) in 40 ml DMF gegeben und nach 15 min mit H-Pro-Ala-OMe (11.4 g, 57 mmol) in 25 ml CH_2Cl_2 versetzt. Nach 90 min bei 0°C und 5 h bei Raumtemp. wird das DCH abfiltriert und die Lösungsmittel i.Vak. verdampft. Das Tripeptid Z-Gly-Pro-Ala-OMe wird analog der Aufarbeitung von Boc-Pro-Ala-OMe nach Umkristallisieren aus EE/PE als dünnschichtchromatographisch einheitliches Produkt isoliert.
Ausbeute: 17.8 g (78 %);
Schmp.: 148°C; R_F (I) = 0.85; R_F (II) = 0.55; R_F (V) = 0.4.
Aminosäurenanalyse: Pro 0.99(1); Ala 1.00(1); Gly 1.00(1).
$C_{19}H_{25}N_3O_6$ (391.44)

ber.	C	58.31	N	6.39	N 10.74
gef.	C	59.52	H	6.12	N 9.96

Z-Gly-Pro-Ala-OH

Z-Gly-Pro-Ala-OMe (16.8 g, 43 mmol) wird in 70 ml MeOH durch Zugabe von 0.5 N NaOH (120 ml) innerhalb von 30 min verseift, mit 0.5 N HCl auf pH 8-9 gestellt; das MeOH wird i.Vak. verdampft und der Rückstand mit EE extrahiert. Nach Ansäuren der wässrigen Phase auf pH 3 wird die Tripeptidsäure mit EE extrahiert. Nach Waschen mit gesättigter NaCl-Lösung, Trocknen über Na_2SO_4 wird das Tripeptid durch Zugabe von PE als DC-reines Produkt ausgefällt.
Ausbeute: 13.4 g (82 %);
Schmp.: 145°C; R_F (I) = 0.68; R_F (II) = 0.26; R_F (IV) = 0.54; R_F (VI) = 0.81;
$C_{18}H_{23}N_3O_6$ (377.39)

ber.	C	57.21	H	6.10	N 11.14
gef.	C	57.63	H	5.82	N 11.03

Z-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu

Z-Gly-Pro-Ala-OH (13.3 g; 35.2 mmol) und HOBt (4.7 g, 35.2 mmol) in DMF/CH_2Cl_2 (3:1, v/v) werden bei 0°C mit DCC (7.2 g, 35.2 mmol) versetzt. Nach 20 min wird H-Thr-(tBu)-OtBu (9.4 g, 40.6 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Nach Absaugen des DCH wird das Tetrapeptid (9.6 g, 1. Fraktion) wie für Boc-Pro-Ala-OMe beschrieben, isoliert. Das Peptid kristallisiert spontan aus 15 ml MeOH/Ether (1:2, v/v) durch Zugabe von PE. Durch Waschen des abfiltrierten DCH (s.o.) mit MeOH, verdampfen des Lösungsmittels und waschen der EE-Lösung wird eine zweite Fraktion Tetrapeptid (4.68 g) erhalten.
Ausbeute: 14.28 g (67 %);
Schmp.: 118°C; R_F (I) = 0.84; R_F (X) = 0.72; R_F (IV) = 0.86; $[\alpha]_D^{20}$ = -93.7° (c = 1, MeOH).
Aminosäurenanalyse: Ala 0.97(1); Pro 1.00(1); Gly 0.98(1); Thr 0.99(1).

$C_{30}H_{46}N_4O_8$ (590.72)

ber.	C	60.91	H	7.78	N	9.47
gef.	C	61.75	H	7.11	N	9.30

H-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu

Z-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu) (2 g, 3.38 mmol) wird in 30 ml MeOH/H_2O (9:1; v/v) mit 120 mg Pd/C im H_2-Durchflußstrom hydriert. Nach 30 min wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand mit Ether gefällt. Der farblose Tetrapeptidester wird sofort zur nächsten Stufe eingesetzt.
Ausbeute: 1.4 g (92 %);
R_F (I) = 0.46; R_F (IV) = 0.8; R_F (III) = 0.71.

$C_{22}H_{40}N_4O_6$ (456.58)

ber.	C	57.89	H	8.77	N	12.28
gef.	C	57.22	H	7.93	N	12.15

H-Gly-Pro-Ala-Thr-OH x HCl (TMV-4 x HCl)

H-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu (1.4 g, 3.07 mmol) wird in 3 ml TFE/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) bei Raumtemp. unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit entacyliert. Nach 3 h wird i.Vak. eingedampft und der ölige Rückstand mit Ether gefällt. Das hygroskopische, chromatographisch reine Tetrapeptid-trifluoracetat wird in 6 ml H_2O gelöst und 15 min mit DOWEX 1X4 (Cl^-)-Ionenaustauscher behandelt. Nach Abfiltrieren des Austauschers wird lyophilisiert.
Ausbeute: 1 g (94 %);
Schmp.: 95-100°C; R_F (IV) = 0.13; R_F (III) = 0.14;
R_F (VII) = 0.3; R_F (VI) = 0.22.
$C_{14}H_{24}N_4O_6$ x HCl (380.5)

ber.	C	44.15	H	6.30	N 14.71
gef.	C	44.84	H	6.91	N 13.82

Boc-HSc-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu

Zu einer Mischung von Boc-HSc (670 mg, 2.88 mmol), H-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu (1.2 g, 2.63 mmol) in 20 ml CH_2Cl_2 und HOBt (388 mg, 2.88 mmol) in 3 ml DMF wird bei 0°C DCC (590 mg, 2.88 mmol) zugegeben und 14 h gerührt. Die Lösungsmittel werden i.Vak. verdampft und das Produkt isoliert (vgl. Dipeptid Boc-Pro-Ala-OMe). Nach wiederholtem Ausfällen aus Ether und verdampfen des Lösungsmittels wird ein farbloses Peptidkonjugat erhalten.
Ausbeute: 1.51 g (79 %);
Reinheit: 95 % (DC).

Verunreinigungen werden durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 entfernt: Säule 75 x 3.4 cm; Eluent $CHCl_3$/MeOH (1:1, v/v); Fraktionen à 4 ml, Fließgeschwindigkeit 60 Tropfen/min; Aufgabenmenge: 190 mg. Die Fraktionen

63-73 enthalten DC-reines Produkt.
Ausbeute: 163 mg (68 %);
Schmp.: 71°C (Zers.); R_F (I) = 0.77; R_F (V) = 0.25;
R_F (IV) = 0.91.
$C_{31}H_{54}N_6O_{10}$ (670.8)

ber.	C	55.52	H	8.05	N 12.53
gef.	C	55.41	H	8.19	N 12.67

HSc-Gly-Pro-Ala-Thr-OH x TFE (HSc-TMV-4 x TFE)

Boc-HSc-Gly-Pro-Ala-Thr(tBu)-OtBu (0.5 g, 0.74 mmol) werden unter Luftfeuchtigkeitsausschluß mit 3 ml TFE entacyliert. Nach 3 h wird TFE i.Vak. entfernt und das Produkt durch Zugabe von Ether ausgefällt.
Ausbeute: 480 mg (94 %);
Schmp.: 105-110°C; $[\alpha]_D^{20}$ = -78° (c = 0.2; H_2O); R_F (VII) = 0.26; R_F (VI) = 0.17.
Aminosäurenanalyse: Ala 1.03(1); Pro 0.96(1); Gly 1.00(1); Thr 0.98(1).
$C_{20}H_{30}N_6O_{10}F_3$ (571.49)

ber.	C	42.03	H	5.25	N 14.71
gef.	C	41.70	H	5.98	N 14.08

Das HSc-Peptid wird ohne längere Lagerung mittels Azidkupplung nach der Methode wie unter F. 4.4. beschrieben in unterschiedlichen Beladung an Poly(L-Lys), HSA und Aminosepharose gekuppelt (vgl. Tab. F. 4).

4. Darstellung der Polymer-Peptidkonjugate

Folgende Peptide wurden über ihre freien Carboxygruppen mittels wasserlöslichen EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide hydrochlorid; Sigma) [199,200] an HSA, BSA (Behring, Marburg) und KLH (key hole limpet hemocyanin, Sigma) gekuppelt:

1. α-IFN-5:	H_2N-Ala-Glu(COOH)-Ile-Met-Arg(H^+)-COOH
2. γ-IFN-5:	H_2N-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-COOH
3. NC-9:	H-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu(COOH)Tyr-Val-COOH
4a. N_α-Fmoc-NC-9:	Fmoc-Leu-Lys-Leu-Leu-Leu-Lys-Glu(COOH)-Tyr-Val-COOH
4b. $N_\alpha, N_\varepsilon, N_\varepsilon'(Fmoc)_3$-NC-9:	N_α-Fmoc-Leu-Lys(Fmoc)-Leu-Leu-Leu-Lys(Fmoc)-Glu(COOH)-Tyr-Val-COOH

Freie Aminogruppen können zu Nebenreaktionen führen!

4.1. Allgemeine Vorschrift

Zu einer Lösung des Trägerproteins (0.2 µmol) in 0.5 ml H_2O wird das Peptid (20 µmol, 100-facher Überschuß) in 0.5 ml DMF bzw. H_2O bei Raumtemp. zugegeben. Nach Zugabe von EDC (200 µmol) wird pH 4.5-5 eingestellt und über Nacht gerührt, wobei meistens eine Trübung auftritt. Sollte die Lösung gallertartig erstarren, wird mit dest. H_2O verdünnt. Die Reaktion kommt durch Dialyse zum Stillstand (2 d gegen 0.01 N Essigsäure, 1 d gegen dest. H_2O, 5 l-Dialyseflüssigkeit, Zusatz von jeweils 0.1 % NaN_3; Visking-Dialyseschlauch SERVA Ø = 1 cm).
Nach beendeter Dialyse wird lyophilisiert.

4.2. Kupplung von α-IFN-5 an HSA mittels Xylylendiisocyanat (XDC) [201]

Zu α-IFN-5 x 2 HCl (5 mg, 7.4 µmol) in 0.5 ml DMF/H_2O (1:1, v/v) wird bei 4°C Xylylendiisocyanat (18 mg, 96 µmol) gegeben. Nach 5 min bei Raumtemp. wird HSA (10 mg, 0.15 µmol) zugegeben, worauf sich sofort ein farbloser, unlöslicher Niederschlag bildet. Nach 3 h bei Raumtemp. wird der Niederschlag abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet.
Ausbeute: 22 mg wasserunlösliches Konjugat.

Die Beladung an kovalent gebundenem Peptid wird mittels ASA durch Auskratzen des Protein-Peptid-Konjugats aus der DC-Platte nach Chromatographieren in DC-System VI bestimmt (vgl. Tab. F.3.).

4.3. Entacylierung des N_α-Fmoc-NC-9-BSA-Konjugats

Lyophilisiertes N_α-Fmoc-NC-9-BSA (88 mg) wird in 5 ml DMF suspendiert und mit 1 ml Piperidin 1 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum verdampft, der Rückstand mehrmals mit Ether gewaschen, getrocknet, in H_2O suspendiert, mit Essigsäure auf pH 5-6 eingestellt und 2 d gegen dest. H_2O dialysiert.
Ausbeute: 68 mg unlösliches Konjugat.

Analog wird N_α,N_ε, N_ε'-$(Fmoc)_3$-NC-9-BSA entacyliert.

4.4. Kupplung von Hydrazidosuccinyl-(HSc)-Verbindungen an Polymere, z.B. a) Proteine, b) Polyaminosäuren, c) unlösliche Polymere (z.B. Aminosepharose)

Allgemeine Vorschrift:
Zur einer Lösung von HSc-Konjugat (180 µmol) in DMF (1 ml)

wird bei -20°C (Aceton/Trockeneis) konz. HCl (90 µl, 1.08 mmol, entspr. 6 molarer Überschuß) gegeben. Bei -15°C wird 14 % $NaNO_2$-Lösung (270 µmol, 133 µl, entspr. 1.5 molarer Überschuß bezogen auf HSc-Konjugat) zugegeben.

Nach 5 min wird auf -25°C gekühlt und mit N-Ethylpiperidin (125 µl) auf pH 7-8 gestellt. Zu dieser Mischung mit der kopplungsfähigen Azidverbindung wird

a) das Protein z.B. HSA (1.8 µmol) in 1ml H_2O zugegeben. Nach 24 h bei 4°C, wird 2 d gegen 0.01 N Essigsäure und 1 d gegen dest. H_2O dialysiert, dann lyophilisiert.

b) die Polyaminosäure, z.B. Polylysin x HBr, in 1 ml H_2O zugegeben (der pH-Wert der Polylysin-Lösung wird vorher mit N-Ethylpiperidin auf pH 9 gestellt; das für die Reaktion verwendete Verhältnis Polylysin/HSc-Peptid richtet sich nach der gewünschten Beladung mit Peptid und ist Tabelle F. 4 zu entnehmen).
Nach 24 h bei 4°C wird mit 1 N HCl auf pH 1-2 gestellt und 3 d gegen 0.01 N Essigsäure und 1 d gegen dest. H_2O dialysiert, danach lyophilisiert.

c) die Aminosepharose 4B, hier 2-Aminoethyl-1-amino Sepharose (3.1 µmol NH_2-Gr/g Harzgequollen in Puffer (0.1 mol $NaHCO_3$/0.5 mol NaCl, pH 8.6) zugegeben. Nach 2 h in einer Schüttelente mit Glasfritte wird abgesaugt und das Polymer im Wechsel mit DMF und Puffer gewaschen. Zuletzt wird zur Lagerung bei 4°C mit 0.01 % NaN_3-Lösung gewaschen.

4.5. Beispiele für Kupplungen von ungeschützten HSc-Peptiden

HSA-$(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{16\text{-}18}$

Kupplung analog Methode 4.4.a. mit HSc-TMV-4 x TFE (10 mg, 17.5 µmol) und HSA (11.5 mg, 175 µmol) in DMF/H_2O (1:3), 24 h bei 4°C. Ausbeute: 13 mg Konjugat (vgl. Tab. F. 3).

Poly-L-$(Lys)_{380}$-$(Sc\text{-}TMV\text{-}4)_{380}$

Kupplung analog Methode 4.4.b. mit HSc-TMV-4 x TFE (122 mg, 213 µmol) und Poly$(L\text{-}Lys)_{380}$ (20 mg, 95 µmol NH_2-Gruppen), 24 h bei pH 9 in 2.5 ml H_2O/DMF 1:1 (v/v). Nach Ansäuern mit 1 N HCl auf pH 2 wird lyophilisiert. Ausbeute: 42 mg wasserlösliches Konjugat. Weitere Polylysin-TMV-4-Peptid-Konjugate sind in Tab. F. 4 zusammengestellt.

Sepharose(4B)-NH-$(CH_2)_2$-NH-Sc-TMV-4

Kupplung analog 4.4.c. mit HSc-TMV-4 x TFE (150 mg, 262 µmol) in 2 ml DMF und Sepharose (4B)-NH-$(CH_2)_2$-NH_2 (5 g in 15 ml Kupplungspuffer pH 8.6 gequollen, 50-55 µmol NH_2-Gruppen). Reaktionsdauer 24 h in einer Schüttelente bei 4°C.

HSc-NC-14 x 2 TFE wird analog gekuppelt (vgl. Tab. F.3).

Sepharose (4B)-NH-$(CH_2)_2$-NH_2

Lyophilisierte CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia) (5 g) wird 15 min in 10^{-3} N HCl gequollen, mehrmals mit 100 ml Por-

Tab. F.3: Polymer-Peptid-Konjugate

Polymer-Peptidkonjugat	a	b	c	d	e	f	g
BSA-(α-IFN-5)	EDC	100:1	H_2O	pH 5	teilw.löslich	16-18	18 %
HSA-(α-IFN-5)	EDC	100:1	H_2O	pH 5	teilw.löslich	16-18	18 %
HSA-(α-IFN-5)	XDC	13:1	DMF/H_2O 1:1	pH 7	unlöslich	30-33	33 %
KLH-(α-IFN-5)	EDC	100:1	H_2O	pH 8	unlöslich	nicht bestimmt	
HSA-(γ-IFN-5)	EDC	100:1	H_2O/DMF	pH 8	teilw.löslich	13-16	14 %
BSA-(NC-9) (mit N_α-Fmoc-NC-9 gekuppelt)	EDC	50:1	DMF/H_2O 1:1	pH 5	unlöslich	20-23	36 %
BSA-(NC-9) (mit N_α, N_ε,N_ε'-$(Fmoc)_3$-NC-9 gekuppelt)	EDC	50:1	DMF/H_2O 2:1	pH 5	unlöslich	3-4	7.2 %
HSA-(Sc-γ-IFN-7)	Azid	100:1	DMF/H_2O 2:1	pH 7-8	unlöslich	60-70	41 %
HSA-(Sc-NC-14)	Azid	100:1	DMF/H_2O	pH 7-8	lösl. ab pH 7	7-8	19 %
HSA-(Sc-TMV-4)	Azid	28:1	DMF/H_2O 1:3	pH 7-8	teilw.löslich	6-8	4 %
	Azid	100:1	DMF/H_2O 1:3		teilw.löslich	16-18	10 %
Amino-Sepharose-TMV-4	Azid	50:1	DMF/Puffer	8.6	10-11 µmol Pept./g trockenes Gel		
Amino-Sepharose-NC-14	Azid	100:1	DMF/Puffer	8.6	9 µmol Pept./g trockenes Gel		

a) Kupplungsmethode; b) eingesetztes molares Verhältnis Peptid zu Polymer; c) Kupplungsmedium; d) pH-Wert bei der Kupplung; e) Löslichkeit des Konjugats in H_2O bzw. Puffer; f) Beladung Peptidreste pro Molekül Polymer; g) Gewichtsprozent gekuppeltes Peptid

Tab. F.4: Poly(L-Lysin)-Tetrapeptidkonjugate mit dem Verbrückungsreagenz HSc

Konjugat	a	b	c	d	e
Poly-(L-Lys)$_{380}$-[Sc-TMV-4]$_{380}$	1:2.2	1:1	100 %	2.2	45 %
Poly-(L-Lys)$_{180}$-[Sc-TMV-4]$_{90}$ x HCl	1:0.55	1:0.39	50 %	1.42	71 %
Poly-(L-Lys)$_{380}$-[Sc-TMV-4]$_{170}$ x HCl	1:0.63	1:0.45	45 %	1.36	74 %
Poly-(L-Lys)$_{180}$-[Sc-TMV-4]$_{70}$ x HCl	1:0.54	1:0.42	38 %	1.28	77 %
Poly-(L-Lys)$_{380}$-[Sc-TMV-4]$_{74}$ x HCl	1:0.216	1:0.194	19.4 %	1.11	90 %
Poly-(L-Lys)$_{380}$-[Sc-TMV-4]$_{64}$ x HCl	1:0.184	1:0.174	17.4 %	1.05	95 %
Poly-(L-Lys)$_{380}$-[Sc-TMV-4]$_{32}$ x HCl	1:0.088	1:0.084	8.4 %	1.04	96 %

a: eingesetztes Verhältnis von vorhandenen Lys-ε-Aminogruppen zu Tetrapeptid

b: mittels Aminosäurenanalyse bestimmtes Verhältnis von vorhandenen Lys-ε-Aminogruppen in Tetrapeptid

c: prozentuale Beladung der Polylysinaminogruppe

d: molarer Überschuß an eingesetztem Peptid bezogen auf tatsächlich erhaltene Beladung

e: prozentualer Anteil an eingesetztem Peptid, der gekuppelt hat

tionen 10^{-3} N HCl und zuletzt mit Kupplungspuffer (0.1 mol $NaHCO_3$, 0.5 mol NaCl, pH 8.6) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml Ethylendiamin (Merck) wird 2 h bei Raumtemp. in einer Schüttelente geschüttelt. Das Harz wird abfiltriert, mehrmals mit Kupplungspuffer, und zuletzt zur Lagerung bei 4°C mit 0.1 % NaN_3-Lösung gewaschen.

5. Synthese der Hydrazido-succinyl(HSc)-Crosslinker-Verbindungen und verwandter Derivate

Die für die Synthesen verwendeten Verbindungen Bernsteinsäureanhydrid und tert. Butylcarbazat sind von Fluka, Z-Hydrazid von Bachem, Fmoc-Hydrazid wurde nach der Methode von Carpino [112] synthetisiert.

N^h-Tert.-Butyloxycarbonylbernsteinsäuremonohydrazid (Boc-HSc-OH)

Bernsteinsäureanhydrid (10 g, 0.1 mol) in 350 ml trockenem THF wird mit Tert.-Butylcarbazat (13.86 g, 0.105 mol) in 25 ml CH_2Cl_2 tropfenweise während 5 min unter Rühren versetzt. Bei Einsetzen der Reaktion steigt die Temperatur auf 40-50°C. Man rührt 2 h unter Feuchtigkeitsausschluß und entfernt das Lösungsmittel i.Vak. Der farblose sirupöse Rückstand wird mit 30-40 ml EE und 10-15 ml MeOH gelöst. Unter starkem Rühren gibt man langsam PE 30/50 so zu, daß es nicht zum Ausölen der Substanz kommt. Zwischen den Zugaben des Petrolethers ist es ratsam, einige Minuten zu warten. Haben sich schließlich feine Kristalle gebildet, gibt man nur noch wenig PE zu und läßt ca. 30 min rühren, bis das Produkt langsam anfängt auszufallen. Es wird nun im Wechsel PE 30/50 und Diethylether in 10 ml Portionen bis zur quantitativen Fällung

zugegeben. Das Produkt ist gut löslich in H_2O, DMF, MeOH, THF und CH_2Cl_2. Es ist unlöslich in Ether und PE.
Ausbeute: 21.1 g (91 %); Reinheit: ≥ 98 % (DC);
R_F (I) = 0.58; R_F (II) = 0.38; R_F (IV) = 0.37;
$C_9H_{16}N_2O_5$ (232.23)

ber.	C	46.55	H	6.09	N 12.06
gef.	C	46.15	H	6.17	N 12.23

^{13}C-NMR (D_2O): δ (ppm) = 177.4 (Sc-COOH), 180.9 (Sc-CO-N_2H_2-), 166.2 (Boc-CO), 85.5 (Boc-C_q), 30.1 (Boc-CH_3), 33.0, 31.7 (Sc-CH_2).

^{1}H-NMR (D_2O): δ = 1.36 (s, Boc-CH_3), 2.22 (s, Sc-CH_2), 6.48 (s, Hydrazid-NH).

N^h-Benzyloxycarbonyl-bernsteinsäuremonohydrazid (Z-HSc-OH)

Bernsteinsäureanhydrid (2 g, 0.02 mol) in 30 ml trockenem Tetrahydrofuran wird mit Benzyloxycarbonylhydrazid (3.48 g, 0.021 mol) in 20 ml CH_2Cl_2 tropfenweise bei Raumtemp. versetzt. Nach 30 min wird i.Vak. eingeengt, wobei sich das Produkt kristallin ausscheidet. Zur quantitativen Fällung versetzt man mit 40-50 ml Ether/PE 1:2 (v/v). Das Produkt ist löslich in THF, DMF und niederen Alkoholen.
Ausbeute: 4.65 g (93 %);
Schmp.: 135°C; R_F (I) = 0.63; R_F (IV) = 0.28; R_F (V) = 0.12.
$C_{12}H_{14}O_4N_2$ (250.25)

ber.	C	57.60	H	5.60	N 11.20
gef.	C	57.45	H	5.51	N 11.03

^{13}C-NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 175.9 (Sc-COOH), 174.2 (Sc-CO-N_2H_2-), 158.4 (Z-CO), 136.1 (C-1 ar), 129.4 (C-3,5 ar), 129.1 (C-2,6 ar), 128.9 (C-4 ar), 68.3 (Benzyl-CH_2), 30.7, 29.8 (Sc-CH_2).

^{1}H-NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 7.32 (5H, ar), 5.12 (s, Benzyl-CH_2), 2.54 (q, Sc-CH_2).

N^h-Fluorenylmethoxycarbonyl-bernsteinsäuremono-hydrazid (Fmoc-HSc-OH)

Bernsteinsäureanhydrid (1 g, 10 mmol) wird in 15-20 ml THF tropfenweise bei Raumtemp. mit Fmoc-NH-NH_2 (2.58 g, 10.2 mmol) in 60 ml THF/DMF (3:1) versetzt. Nach 1 h bei Raumtemp. wird Lösungsmittel i.Vak. verdampft. Der ölige Rückstand wird aus CH_2Cl_2/PE (30/50) umkristallisiert. Das Produkt ist löslich in THF, DMF und niedrigen Alkoholen.
Ausbeute: 3.26 g (92 %);
Schmp.: 171°C; R_F (I) = 0.62; R_F (II) = 0.36; R_F (IV) = 0.34;
$C_{19}H_{18}N_2O_5$ (354,36)

ber.	C	64.40	H	5.08	N 7.90
gef.	C	64.29	H	5.19	N 7.8

^{13}C-NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 176.1 (Sc-COOH), 174.2 (Sc-CO-N_2H_2), 158.3 (Fmoc-CO); aromat. Fluorenyl-C: 144.7 (C-9a,b), 142.1 (C-4a,b), 128.4 (C-2,7), 127.8 (C-3,6), 126.0 (C-1,8), 120.7 (C-4,5); 68.6 (Fmoc-CH_2), 47.9 (Fmoc-CH), 29.8, 29.4 (Sc-CH_2).
^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 9.71, 9.22 (2s, Hydrazid-NH), 7.29-7.92 (m, Fluorenyl-Aromaten), 4.27 (s, Fmoc-CH_2 und CH), 2.49 (m, Sc-CH_2).

N^α-(N^h-Tert.Butyloxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-glycin-benzylester (Boc-HSc-Gly-OBzl)

Boc-HSc-OH (2.56 g, 11 mmol), Glycinbenzylester-p-tosylat (3.72 g, 11.1 mmol), NMM (1.34 ml, 11.1 mmol) und HOBt

(1.68 g, 11 mmol) werden in 20 ml DMF bei 0°C mit DCC (2.27 g, 11 mmol) versetzt. Die Lösung läßt man unter Rühren auf Raumtemp. kommen. Nach 12 h wird der ausgefallene DCH abfiltriert. Lösungsmittel werden im Hochvakuum verdampft und der ölige Rückstand in EE aufgenommen und nochmals von ausgefallenem DCH abfiltriert. Die EE-Phase wird je 3 x mit 5 % $KHCO_3$ und 5 % $KHSO_4$-Lösung extrahiert, mit ges. NaCl-Lösung neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Produkt kristallisiert aus EE durch langsame Zugabe von Ether und PE 30/50.
Ausbeute: 3.1 g (75 %); Reinheit 96 % (enthält Spuren von DCH); R_F (I) = 0.79; R_F (II) = 0.52; R_F (IV) = 0.91
$C_{18}H_{27}N_3O_6$ (381.42)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$); δ (ppm) = 172.2 (Sc-CO), 172.7 (Sc-CO-N_2H_2-), 170.0 (Gly-CO), 155.6 (Boc-CO), 135.2 (C-1, ar), 128.4 (C-3,5 ar), 128.3 (C-2,6 ar), 128.1 (C-4 ar), 81.3 (Boc-Cq), 66.9 (Benzyl-CH_2), 41.3 (Gly-C_α), 30.8, 29.2 (Sc-CH_2), 28.1 (Boc-CH_3).

N^α-(N^h-Tert.Butyloxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-glycin (Boc-HSc-Gly-OH)

Boc-HSc-Gly-OBzl (3.1 g, 8.2 mmol) wird in 25 ml MeOH 3 h mit Pd/C unter H_2-Druchfluß hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das MeOH i.Vak. verdampft. Der Rückstand wird durch langsame Zugabe von PE 30/50 umkristallisiert. Das Produkt ist löslich in H_2O, THF, DMF und niederen Alkoholen.
Ausbeute: 2.9 g (80 %);
Schmp.: 136°C (PE); R_F (I) = 0.37; R_F (II) = 0.06;
R_F (III) = 0.78.
$C_{11}H_{18}N_3O_6$ (288.28)

^{13}C-NMR (D_2O): δ (ppm) = 177.6 (Sc-COOH), 177.4 (Sc-CO-N_2H_2-), 176.3 (Gly-CO), 166.7 (Boc-CO), 85.6 (Boc-Cq), 43.7 (Gly-C_α), 32.8, 31.2 (Sc-CH_2), 30.0 (Boc-CH_3).

^{1}H-NMR (D_2O): δ (ppm) = 1.32 (s, Boc-CH_3), 2.49 (s, Sc-CH_2), 3.83 (s, Gly-NH), 1.12 (s, Gly-CH_2).

N^α-(N^h-Tert.Butyloxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-glycin-N-Hydroxysuccinimidester (Boc-HSc-Gly-OSu)

Boc-HSc-Gly-OH (1.4 g, 4.84 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (0.58 g, 5.08 mmol) werden in 15 ml DMF/CH_2Cl_2 (1:2) bei 0°C mit DCC (0.99 g, 4.84 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch läßt man auf Raumtemp. erwärmen und rührt weitere 3 h. Der ausgefallene DCH wird abgesaugt und das Lösungsmittel i.Vak. verdampft. Nach Lösen des öligen Rückstands in EE wird weiterer ausgefallener DCH abgesaugt. Die EE-Phase wird auf 4-5 ml eingeengt und langsam unter Rühren in 100 ml kalten Diethylether eingetropft. Der flockige oder ölige Niederschlag wird abzentrifugiert und restliches Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Man erhält ein farbloses, amorphes, hygroskopisches Produkt, welches sich gut in H_2O, DMF, THF, $CHCl_3$ und niederen Alkoholen löst. Das Produkt ist bei 4°C über mehrere Wochen lagerfähig.

Ausbeute: 1.4 g (75 %); Reinheit: 95 % (DC); R_F (I) = 0.62; R_F (II) = 0.13.

$C_{15}H_{22}N_4O_8$ (386.36)

N^{α}-(N^{h}-Benzyloxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-glycin-tert.-butylester (Z-HSc-Gly-OtBu)

N^{α}-(N^{h}-Fluorenylmethoxycarbonyl-hydrazido)-succinyl-tert.-butylester (Fmoc-HSc-Gly-OtBu)

Z-HSc-Gly-OtBu und Fmoc-HSc-Gly-OtBu werden entsprechend dem Verfahren für Boc-HSc-Gly-OBzl synthetisiert. Es wird ein 1.05-1.1-facher Überschuß an H-Gly-OtBu x HCl eingesetzt. Die Reaktionen werden in DMF (bei Z-HSc-Gly-OtBu) und THF (bei Fmoc-HSc-Gly-OtBu) durchgeführt.

Z-HSc-Gly-OtBu:
Ausbeute: 65 %;
Schmp.: 115°C (EE/Ether); R_F (I) = 0.85; R_F (II) = 0.54; R_F (V) = 0.18;
$C_{18}H_{25}O_6N_3$ (379.41)

^{13}C-NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 174.7 (Sc-CO-N_2H_2-), 174.2 (Sc-CO), 170.5 (Gly-CO), 137.6 (Z-C-1 ar), 129.6 (Z-C-3,5 ar), 129.1 (Z-C-2,6 ar), 128.9 (C-4 ar), 82.8 (Boc-Cq), 42.9 (Gly-C_α), 31.5, 30.0 (Sc-CH_2), 28.3 (Boc-CH_3).

Fmoc-HSc-Gly-OtBu:
Ausbeute: 67 %;
Schmp.: 105-110°C (MeOH/EE/PE 30-50); R_F (I) = 0.85; R_F (II) = 0.54; R_F (V) = 0.18;
$C_{25}H_{29}N_3O_6$ (467.52)

^{13}C-NMR (CD_3OD): δ (ppm) = 174.2 (Sc-CO), 174.7 (Sc-N_2H_2-), 170.6 (Gly-CO), 158.8 (Fmoc-CO); aromat. Fluorenyl-C-Atome: 145.0 (C-9a,b), 142.5 (C-4a,b), 128.8 (C-2,7), 128.2 (C-3,6), 126.2 (C-1,8), 120.9 (C-4,5); 82.7 (Boc-Cq), 68.6 (Fmoc-CH_2), 48.5 (Fmoc-CH), 42.9 (Gly-C_α), 31.5, 30.0 (Sc-CH_2), 28.7 (Boc-CH_3).

N^{α}-(N^{h}-Benzyloxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycin (Z-HSc-Gly-OH)

N^{α}-(N^{h}-Fluorenylmethoxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycin (Fmoc-HSc-Gly-OH)

10 mmol Z-HSc-Gly-OtBu bzw. Fmoc-HSc-Gly-OtBu werden 15-30 min unter Luftfeuchtigkeitsausschluß mit 15 ml trockener TFE oder 1.2 N HCl/Eisessig gerührt. Man engt auf etwa 3-4 ml ein und tropft in ca. 100 ml kalten Ether ein. Das Produkt fällt flockig aus.

Z-HSc-Gly-OH:
Ausbeute: 90 %;
Schmp.: 168°C (Ether); R_F (I) = 0.29; R_F (II) = 0.1;
R_F (III) = 0.6;
$C_{14}H_{17}O_6N_3$ (323.3)

Fmoc-HSc-Gly-OH:
Ausbeute: 88 %;
Schmp.: 175°C (Ether); R_F (I) = 0.46; R_F (II) = 0.1;
R_F (III) = 0.83;
$C_{21}H_{21}N_3O_6$ (411.41)

N^{α}-(N^{h}-Benzyloxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycin-N-Hydroxy-succinimidester (Z-HSc-Gly-OSu)

N^{α}-(N^{h}-Fluorenylmethoxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycin-N-Hydroxysuccinimidester (Fmoc-HSc-Gly-OSu)

Zur Synthese von Z-HSc-Gly-OSu und Fmoc-HSc-Gly-OSu wird wie bei Boc-HSc-Gly-OSu verfahren. N-Hydroxysuccinimid wird im 1.05-fachen Überschuß zur Carboxykomponente eingesetzt. Die Reaktion wird im Fall von Z-HSc-Gly-OSu in DMF und bei Fmoc-HSc-Gly-OSu in THF durchgeführt.

Z-HSc-Gly-OSu:
Ausbeute: 85 %; farbloses zähes Öl;
Reinheit: ≥ 90 % (DC); R_F (I) = 0.62; R_F (II) = 0.27;
R_F (III) = 0.77;
$C_{18}H_{20}O_8N_4$ (420.37)

Fmoc-HSc-Gly-OSu:
Ausbeute: 85 %; farbloses Öl;
Reiheit: ≥ 90 %; R_F (I) = 0.67; R_F (II) = 0.31;
$C_{25}H_{24}N_4O_8$ (508.48)

5.1. Typische Anwendungsbeispiele der geschützten HSc-Derivate

Umsetzung von Boc-(Z, Fmoc)-HSc-OH mit C-terminal geschützten Aminosäuren, Peptiden oder anderen Stoffen mit freier Aminogruppe (allgemeine Vorschrift)

Boc(Z, Fmoc)-HSc-OH (11 mmol), HOBt (11 mmol) und N-terminal freies Peptid oder Aminosäure (10 mmol) werden in frisch destilliertem THF, bzw. CH_2Cl_2 oder DMF gelöst und bei 0°C mit DCC (11 mmol) versetzt. Man läßt auf Raumtemp. kommen und rührt 3-4 h. Durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig wird die Reaktion gestoppt. Ausgefallener DCH wird abfiltriert, das Lösungsmittel eingedampft und der Rückstand in EE aufgenommen. Eventuell weiterer ausgefallener Harnstoff wird abgesaugt.

Die Isolierung und Reinigung kann auf zwei Wegen erfolgen:

a) Ausschütteln mit 5 % $KHCO_3$- und 5 % $KHSO_4$-Lösung (je 3 x), Neutralwaschen mit gesättigter NaCl-Lösung, Essigesterphase über Na_2SO_4 trocknen und umkristallisieren (z.B. aus EE/PE).

b) Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel Si 60, z.B. mit $CHCl_3$/MeOH (9:1) oder an Sephadex LH-20 (bei polaren und empfindlichen Substanzen), z.B. mit MeOH oder $CHCl_3$/MeOH (1:1) als Elutionsmittel.

Einsatz von Boc-(Z, Fmoc)-HSc-OH in der Festphasen-Peptidsynthese (Merrifield-Methode)

Die HSc-OH-Derivate sollten bei der Peptidsynthese an polymeren Trägern wegen möglichen Nebenreaktionen nicht als symmetrische Anhydride gekuppelt werden. Es hat sich folgende Methode bewährt: Bei Anwendung z.B. der N_α-Fmoc-Schutzgruppenstrategie wird nach der Fmoc-Abspaltung mittels 50 % Piperidin in DMF, mehrmaligen Waschvorgängen, Boc-(Fmoc)-HSc-OH und HOBt äquimolar (in 6-fachem molarem Überschuß zur Harzbeladung) in den Reaktor gegeben und mit der äquimolaren Menge DCC versetzt. Nach 3 bis 4 h spült man abwechselnd mehrmals mit CH_2Cl_2 und DMF, sowie mit $CHCl_3$/MeOH (1:1).

Kupplung von Boc-(Fmoc)-HSc-OH an Amino-Sepharose-4B (Pharmacia)

In einer Schüttelente werden 1 g Aminosepharose in 4 ml DMF gequollen (Beladung: ~ 3 µmol NH_2-Gruppen pro g lyophilisiertes Gel bzw. 10-11 µmol pro g gequollenes Gel) mit Boc-(Fmoc)-HSc-OH (30 µmol), HOBt (30 µmol) und zuletzt mit DCC oder einem wasserlöslichem Carbodiimid (30 µmol) versetzt. Man läßt 3 h bei Raumtemp. reagieren und wäscht nach beendeter Reaktion mehrmals mit DMF nach. Aufbewahrung des Gels in 0.01 % NaN_3-Lösung bei 4°C. Vor der Schutzgruppenabspaltung (siehe Beispiel D) muß das Gel unter Zusatz von Stabilisatoren (Dextrose, Lactose) gefriergetrocknet werden.

Schutzgruppenabspaltung an Boc(Fmoc,Z)-HSc-Derivaten bzw. Konjugaten

Die Boc-Schutzgruppe ist bei allen Derivaten innerhalb von 5-15 min unter Feuchtigkeitsausschluß mit TFE, TFE/CH_2Cl_2 (1:1) oder 1.2 N HCl/Eisessig abgespalten. Die Lösung der Säure wird dann auf ein Drittel des Volumens eingeengt und das Produkt mit Ether gefällt. Bei unlöslichen Polymeren (z.B. Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren, Sepharose) wird einfach abgesaugt und gut mit DMF und CH_2Cl_2 im Wechsel nachgewaschen.

Die Z-Schutzgruppe läßt sich mittels Pd/Aktivkohle als Katalysator im H_2-Durchflußstrom in organischen Lösungsmitteln (MeOH, AcOH, DMF) abspalten. Die Hydrierdauer beträgt 1-3 h. Eine hydrogenolytische Abspaltung ist oft unmöglich an unlöslichen Polymeren, wohl aber an löslichen Trägern wie z.B. Polyoxyethylen, das z.B. bei der Polymer-Supported-Liquid-Phase-Peptidsynthese verwendet wird.

Die Fmoc-Schutzgruppe läßt sich leicht innerhalb von 5 min in 50 % Piperidin/DMF abspalten. Längere Abspaltungszeiten sind unbedingt zu vermeiden. Nach Entfernung von Piperidin und DMF i.Vak. wird sofort durch Zugabe von 1.2 N HCl/Ether oder 1.2 N HCl/Dioxan das Hydraziniumchlorid gebildet.

Umsetzung von N-terminal freien Aminosäuren, Peptiden, etc. mit Boc-, Fmoc-, Z-HSc-Gly-OSu

Boc-, Z-, Fmoc-HSc-Gly-OSu reagiert in ca. 1.2-fachem molaren Überschuß in Lösungsmitteln wie DMF oder THF innerhalb von 1 bis 3 h quantitativ mit N-terminal freien Aminosäurederivaten oder Peptiden. Entstehendes N-Hydroxysuccinimid wird entweder aus der organischen Phase mit

5 % $KHCO_3$ extrahiert oder über Gelfiltration an Sephadex LH-20, z.B. in $CHCl_3$/MeOH, abgetrennt.

Die Reaktion mit unlöslichen Polymeren (z.B. Merrifield-Harzen, Aminosepharose) wird in 6-10-fachem Überschuß an Boc-, Fmoc-, Z-HSc-Gly-OSu in DMF, DMF/CH_2Cl_2 oder THF durchgeführt. Reaktionszeit 3 bis 4 h bei Raumtemp.

Beispiele:

N^{α}-(N^{h}-Tert. Butyloxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycyl-phenylananyl-tert. butylester (Boc-HSc-Gly-Phe-OtBu)

Boc-HSc-Gly-OSu (1 g, 2.6 mmol), H-Phe-OtBu x HCl (0.53 g, 2.07 mmol) und NMM (230 µl, 2.07 mmol) werden in DMF bei Raumtemp. 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wird vollständig i.Vak. verdampft und 300 mg des öligen Rückstandes an Sephadex LH-20 (2.5 x 90 cm) mit $CHCl_3$/MeOH (1:1) chromatographiert. Man erhält 180 mg farbloses Öl. Reinheit: $\geqslant$ 95 % (DC).

R_F (I) = 0.8; R_F (II) = .37; R_F (V) = 0.15;

$C_{24}H_{36}N_4O_7$ (492.57)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 172.2 (Sc-CO), 172.7 (Sc-CO-N_2H_2-), 170.9 (Gly-CO), 169.0 (Phe-CO), 155.7 (Boc-CO), 136.3 (Phe-C-1), 129.3 (Phe-C-3,5 ar), 128.2 (Phe-C-2 ar), 126.7 (Phe-C-4 ar), 81.3 (Boc-Cq), 82.2 (OtBu-Cq), 54.0 (Phe-C_{α}), 43.1 (Gly-C_{α}), 37.9 (Phe-C_{β}), 31.0, 29.3 (Sc-CH_2), 28.2 (Boc-CH_3), 27.8 (OtBu-CH_3).

N^{α}-(N^{h}-Benzyloxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycyl-phenylalanyl-tert. butylester (Z-HSc-Gly-Phe-OtBu)

und

N^{α}-(N^{h}-Fluorenylmethoxycarbonyl-hydrazid)-succinyl-glycyl-phenylalanyl-tert.butylester (Fmoc-HSc-Gly-Phe-OtBu)

Beide Verbindungen wurden nach der gleichen Methode wie für Boc-HSc-Gly-Phe-OtBu dargestellt. Bezogen auf H-Phe-OtBu x HCl wurde ein 1.2-facher Überschuß an Z-HSc-Gly-OSu bzw. Fmoc-HSc-Gly-OSu eingesetzt. Die Produkte wurden an Sephadex LH-20 mit $CHCl_3$/MeOH (1:1) chromatographiert.

Z-HSc-Gly-Phe-OtBu:
Ausbeute: 80 %;
Schmp.: 60°C ($CHCl_3$/MeOH); Reinheit: $\geq$ 96 % (DC);
R_F (I) = 0.78; R_F (II) = 0.46; R_F (III) = 0.89; R_F (IV) = 0.85;
$C_{27}H_{34}N_4O_7$ (526.59)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 172.5 (Sc-CO), 172.8 (Sc-CO-N_2H_2-), 171.0 (Gly-CO), 169.0 (Phe-CO), 136.2 (Z-C-1 ar), 135.7 (Phe-C-1 ar), 129.4 (Phe-C-3,5 ar), 128.7 (Z-C-3,5 ar), 128.4 (Z-C-2,6 ar), 128.3 (Phe-C-2,6 ar), 128.0 (Z-C-4 ar), 126.8 (Phe-C-4 ar), 82.4 (OtBu-Cq), 67.5 (Benzyl-CH_2), 54.0 (Phe-C_{α}), 43.0 (Gly-C_{α}), 37.9 (Phe-C_{β}), 30.8, 29.2 (Sc-CH_2), 27.8 (OtBu-CH_3).

Fmoc-HSc-Gly-Phe-OtBu:
Ausbeute: 74 %;
Schmp.: 105°C ($CHCl_3$/MeOH); R_F (I) = 0.85; R_F (II) = 0.9;
$C_{34}H_{38}N_4O_7$ (614.69)

^{13}C-NMR: δ (ppm) = 172.5 (Sc-CO), 172.8 (Sc-CO-N_2H_2-), 170.9 (Gly-CO), 169.0 (Phe-CO), 156.5 (Fmoc-CO); aromat. Fluorenyl-C-Atome: 143.5 (C-9a,b), 141.1 (C-4a,b), 129.3 (C-2,7), 128.2 (C-3,6), 125.1 (C-1,8), 119.8 (C-4,5); aromat. Phe-C-Atome: 136.3 (C-1 ar), 127.6 (C-3,5 ar), 127.0 (C-2,6 ar), 126.7 (C-4 ar); 82.1 (OtBu-Cq), 67.6 (Fmoc-CH_2), 53.9 (Fmoc-CH9, 42.7 (Gly-C_α), 37.7 (Phe-C_β), 31.3, 29.1 (Sc-CH_2), 27.8 (OtBu-CH_3).

6. MICRO-ELISA-Immunoassay mit Antiseren gegen Pentapeptid α-IFN-5

Schafs-Anti-Kaninchen-IgG/alkal. Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase (POD), p-Nitrophenylphosphat waren von Sigma, BSA, HSA und KLH von Behring, Marburg, Tween 20 von Fluka und ABTS (2-2'Azino-di[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure von Boehringer Mannheim [203,204]. α-IFN-POD-Konjugate wurden nach der Methode von Nakane synthetisiert [202]. Die Peptid/POD-Verhältnisse, welche zur Reaktion verwendet wurden, betrugen 8:1 und 40:1.

Extinktionen wurden an DYNATECH-Mikrotiterplatten (96 Löcher) mit einem automatischen DYNATECH-Extinktionsmeßgerät durchgeführt. Waschvorgänge erfolgten mittels eines mikroprozeßergesteuerten MICROLAB-Pipettierautomaten (Fa. Hamilton, Schweiz).

Immunisierung

Kaninchen wurden mit folgenden Konjugaten immunisiert:

HSA-α-IFN-5 (EDC)
HSA-α-IFN-5 (XDC)
KLH-α-IFN-5 (EDC)

200 µg Konjugat, 500 µl physiol. NaCl-Lösung und 500 µl des fertigen Freund's Adjuvans wurden subcutan und in Beinmuskeln von Kaninchen immunisiert. Nachimmunisierung alle 2 Wochen; insgesamt 3 Monate.

6.1. Titerbestimmung der α-IFN-5-Antiseren mit MICRO-ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent-Assay)

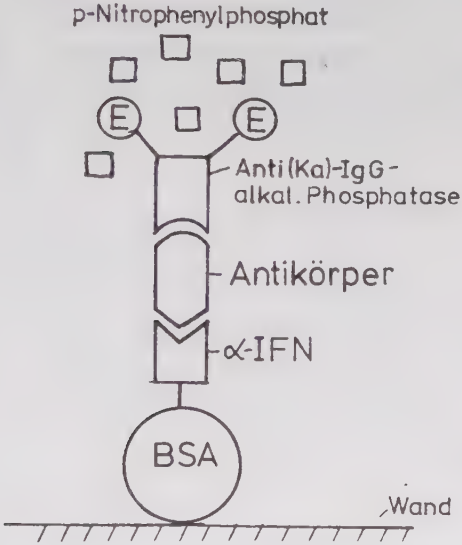


Abb. F.4: Aufbau des Immunoassays

Arbeitsablauf (Vgl. Abb. F.4)

1. Beschichtung
mit 200 µl einer Lösung von BSA-α-IFN-5 (2.5; 5; 10 µg/ml) in Puffer 1. Beschichtungszeit: 90 min.

Bem.: Da sich BSA-α-IFN-5 nicht vollständig in Puffer 1 löst, wird unlösliches Konjugat abzentrifugiert und Konzentration an gelöstem BSA-α-IFN-5 photometrische bei 280 nm im Vergleich zu einer bekannten BSA-Lösung bestimmt.

2. Nachbeschichten
250 µl Puffer 2 (mit 1 % BSA) pro Loch: max. 5-10 min
(Gefahr der Doppelbeschichtung)

3. Waschen:
1 x mit 300 µl Waschlösung 3

4. Inkubation mit Antiserum der
Verdünnungen: 1:100
1:1000
1:10000 in Puffer 2 (mit 1 % BSA)
1:100000
$1:10^6$

200 µl/Loch
Inkubationszeit: 60 min

5. Waschen
3 x mit 300 µl kalter Waschlöung 3

6. Inkubation
mit Schafs-Anti-Ka-IgG/alk. Phosphatase; Enzym-Konjugat-verdünnung:
1:100
1:500 in Puffer 2 (mit 1 % BSA)
1:1000
200 µl/Loch; Inkubationszeit: 60 min

7. Waschen
3 mal mit 300 µl kalter Waschlösung 3

8. Enzym-Substratreaktion
200 µl/Loch einer Lösung von p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Puffer 4

9. Extinktionsmessung
bei 405 nm

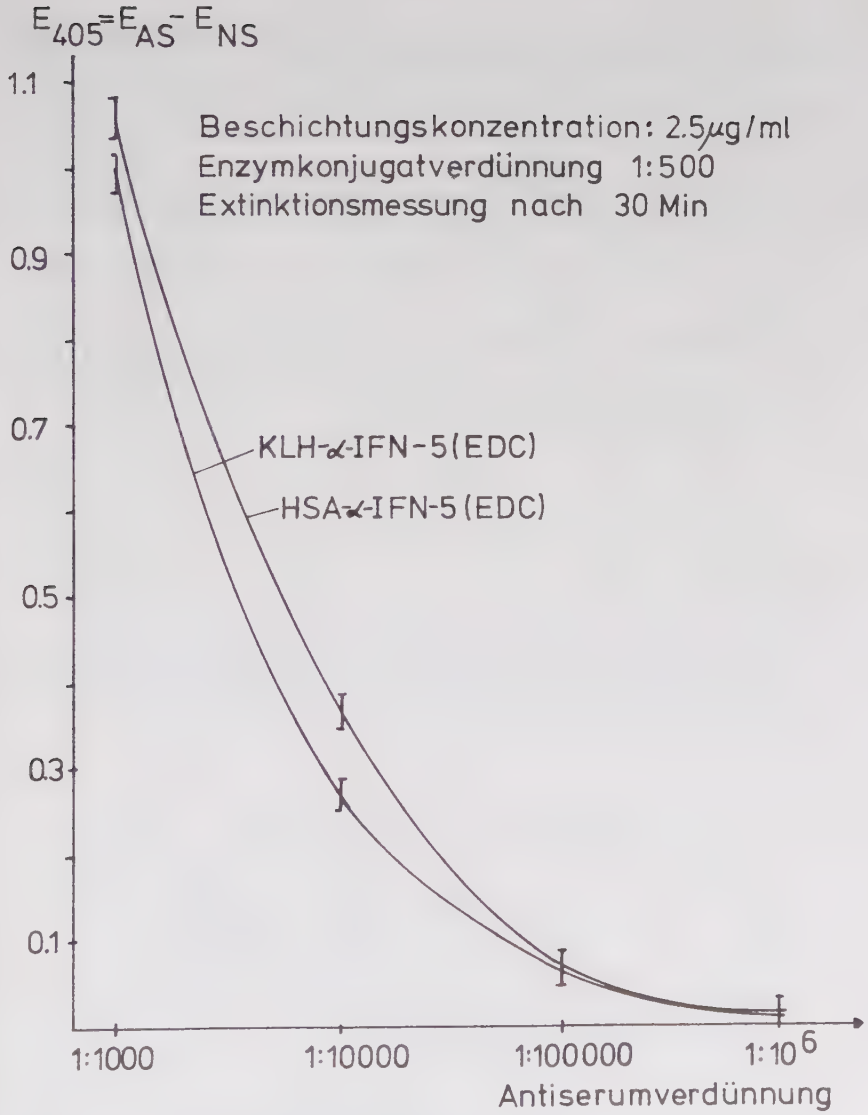


Abb. F.5: Titerkurven der Antiseren gegen α-IFN-5

Optimale Ergebnisse wurden gefunden bei:

a) einer Beschichtungskonzentration von 2.5 µg/ml
b) einer Enzymkonjugatverdünnung von 1:500

Zur Erhöhung der Spezifiät wurde das Rohserum einer kombinierten Aerosil/$(NH_4)_2SO_4$-Fällung unterzogen [21]. Der Anteil an $F_\gamma G$ wurde bei 280 nm zu 5.12 mg/ml bestimmt.

Bei sämtlichen Tests wurde zum Vergleich Kaninchennormalserum verwendet und die Differenz der Extinktionen von Antiserum und Normalserum gebildet:

$$E_{405} = E_{AS} - E_{NS}$$

Ergebnisse:
Beide Antiseren HSA-α-IFN-5 (EDC) und KLH-α-IFN-5 (EDC) zeigen bei Verdünnungen bis zu etwa 1:5000 ähnlich signifikante Extinktionen bzw. gleich gute Antikörpertiter. Bei dem Antiserum von HSA-α-IFN-5 (XDC) wurde kein Titer festgestellt (vgl. Abb. F.5).

6.2. Inhibitionsassay an α-IFN-5-Antiseren

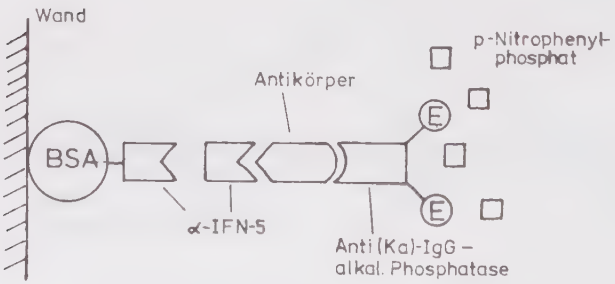


Abb. F.6: Aufbau des Immunoassays

Arbeitsablauf (vgl. Abb. F.6)
Analog zu 6.1.; zusätzlicher Arbeitsschritt 3a: Antigenzugabe von 0.1, 1, 10, 100, 1000 mg/ml in Puffer II (1 x mit 1 % BSA, 1 x ohne BSA), 100 µl/Loch, gleich anschließend 100 µl Antiserum (1:1000)/Loch; effektive Serumverdünnung pro Loch: 1:2000.

Ergebnis:
Es hat keinerlei Inhibition der Bindung durch freies Antigen α-IFN-5 stattgefunden, auch dann nicht, wenn BSA in den Puffern weggelassen wurde.
Eine Veränderung des Inhibitionsassays dahingehend, daß Antigen und Antiserum zusammen 40 min lang vor Zugabe auf der beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert wurden, brachte keinen Erfolg. Letztendlich wurde BSA gänzlich durch Tween 20 (Fluka) ersetzt, was ebenfalls erfolglos blieb.

6.3. Bindungsversuche von α-IFN-5-POD an gereinigtes beschichtetes Antiserum (competitiver ELISA)

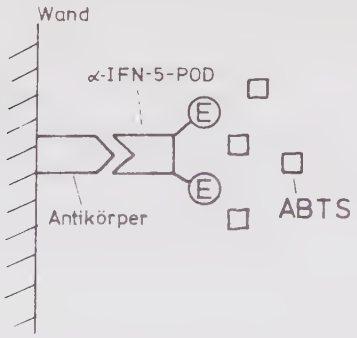


Abb. F.7: Aufbau des Immunoassays

Arbeitsablauf (vgl. Abb. F.7)

1. Beschichtung:
Antiserumverdünnung 1:100, 1:1000 in PBS-Puffer und 0.1 % Tween 20; 90 min; 200 µl/Loch

2. keine Nachbeschichtung

3. Waschen:
2 mal mit 300 µl Waschlösung 3

4. Inkubation:
mit α-IFN-5-POD (8:1 und 40:1) in PBS-Puffer und 0.1 % Tween 20, Verdünnung: 1:100, 1:1000.

5. Waschen:
3 mal mit 300 µl kalter Waschlösung

6. Substratzugabe:
0.018 mol ABTS-Lösung in Substratpuffer 5, 200 µl/Loch

7. Inkubation:
30 min

8. Extinktionsmessung:
bei 405 nm.

Ergebnisse:
Bei den Antiseren HSA-α-IFN-5 (EDC) und KLH-α-IFN-5 (EDC) war keine Extinktion zu messen, und somit keine Bindung festzustellen. Hingegen konnte beim Antiserum von HSA-α-IFN-5 (XDC) eine schwache Bindung festgestellt werden, dies jedoch erst bei einer relativ geringen α-IFN-5-POD-Verdünnung von 1:100. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß das α-IFN-POD (8:1)-Konjugat eine deutlich bessere Bindung zeigt.
Wegen der relativ schwachen und unspezifischen Bindung wurde auf die Durchführung eines weiteren Inhibitions-assays mit α-IFN-5 (XDC)-Antiseren verzichtet.

6.4. Verwendete ELISA-Puffer

Puffer 1 (Beschichtungspuffer):
0.2 mol $Na_2CO_3/NaHCO_3$, pH 9.5 (Carbonat/Bicarbonat)

Puffer 2 (Nachbeladungs/Inkubationspuffer):
0.05 mol Na_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7.2; 0.15 mol NaCl; 0.02 % Natriumazid; 0.001 mol EDTA.
Unmittelbar vor Gebrauch bei Bedarf 1 % BSA zugeben.

Waschlösung 3:
0.15 mol NaCl, 0.02 % Natriumazid und 0.04 % Tween 20

Puffer 4 (Substratpuffer):
48 ml Diethanolamin, 400 ml H_2O, 0.15 ml (1 mol) $MgCl_2$, mit 1 N HCl auf pH 9.8 stellen, auffüllen auf 500 ml.
Unmittelbar vor Gebrauch 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat zugeben.

Puffer 5 (Substratpuffer):
3.3 mmol Natriumperborat, 0.1 mol Na_2HPO_4/Citronensäure, pH 4.4, 1 h vor Gebrauch 1.8 mmol ABTS (MW = 548,7) einwiegen.

PBS-Puffer:

A: 0.015 mol Na_2HPO_4
0.15 mol NaCl

B: 0.015 mol KH_2PO_4
0.15 mol NaCl

durch Zugabe von B zu A auf pH = 7.2 einstellen.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Zur immunologischen Bestimmung von Proteinen wurde eine Anzahl neuer Peptide synthetisiert.

1. Aus der Sequenz des α-Interferons wurde das Pentapeptid α-IFN-5, aus derjenigen des γ-Interferons das Pentapeptid γ-IFN-5 und das Heptapeptid γ-IFN-7 synthetisiert. Diese Peptide wurden nach verschiedenen Methoden in unterschiedlichen Beladungen an Proteine wie Human- Rinderalbumin und Hemocyanin gekuppelt, um in Kaninchen Antikörper zu erzeugen. Gegen α-IFN-5 wurden je nach Ankupplung ans Protein (N- oder C-terminal) gute Antikörpertiter unterschiedlicher, jedoch geringer Spezifität erhalten. Die Antikörper, z.B. gegen α-IFN-5, welches ein tryptisches Peptid vom α-Interferon darstellt, waren zu unspezifisch um einen competitiven ELISA für α-IFN-5 bzw. tryptisch gespaltenes α-Interferon aufbauen zu können.
   Die nach der Festphasenmethode und klassischer Methode dargestellten Interferonpeptide wurde ^{13}C-NMR-spektroskopisch und massenspektroskopisch charakterisiert.

2. Zur immunologischen Bestimmung eines Epitops auf der Oberfläche des TMV-Hüllproteins wurde das C-terminale Tetrapeptid TMV-4 des Hüllproteins synthetisiert. Das Peptid wurde über den neu entwickelten Crosslinker HSc (Hydrazidosuccinyl) an Polylysin und HSA in unterschiedlichen Beladungen gekuppelt. Bei Polylysin mit Molmasse 80000 (380 Lysinmonomere) wurde vollständige Substitution der Lysinreste erhalten. Mit den erhaltenen Konjugaten konnte in einem ELISA-Test die Spezifität eines monoclonalen Antikörpers dem C-terminalen Proteinende zugeordnet werden. In dem ELISA-Immunoassay ließen sich 5.6 fmol polymergebundenes Tetrapeptid nachweisen.

Das Konformationsverhalten der Peptid-Polymer-Konjugate in Abhängigkeit von Peptidbeladung und pH-Wert wurde mit CD untersucht. Weiterhin wurden von den dargestellten Verbindungen ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen. Die antigenen Bereiche des TMV-Proteins wurden an Hand eines Computerprogramms ausgewählt, mit welchem die Sekundärstruktur und Hydrophilie einer Polypeptidkette vorausgesagt werden kann.

3. Aus der mitochondrialen DNA-Sequenz (URF-1) des Pilzes N. crassa wurden ein Nona- und Tetradecapeptid synthetisiert. Die Auswahl der Peptidsequenzen wurde ebenfalls mit Hilfe des erwähnten Computerprogramms getroffen. Nach spezifischer Kupplung dieser Peptide an Proteine, wurden aus Kaninchen Antikörper erhalten, mit welchen sich ein neues Protein nachweisen ließ, dessen Sequenz in dem URF-1 codiert ist. Zur affinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren wurde das Tetradecapeptid über den neuen Crosslinker an Aminosepharose gebunden. Von beiden Peptiden wurden ^{13}C-NMR, CD und Massenspektren aufgenommen.

4. Zur spezifischen N-terminalen Kupplung der oben erwähnten Peptide wurde ein neuer Crosslinker entwickelt. Geschützte Hydrazidosuccinyl (HSc) bzw. Hydrazido-succinyl-Aminosäurederivate dienen zur heterobifunktionellen Verknüpfung von Peptiden und Proteinen. Gleichzeitig konnten die neuen Verbindungen direkt in der klassischen Peptidsynthese und in der Festphasenpeptidsynthese angewandt werden. Die Crosslinker-Derivate wurden ^{13}C- und ^{1}H-NMR-spektroskopisch charakterisiert.

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. Berson, S.A. und Yalow, R.S., Adv. Biol. Med. Phys. 6, 349 (1958).

1a. Lübke, K. und Nieuweboer, B., Immunologische Teste für niedermolekulare Wirkstoffe, S. 42, Thieme Verlag, Suttgart, 1978, und dort zitierte Literatur.

2. Landsteiner, K., "The Specifity of Serological Reactions", Harvard University Press, Cambridge MA, 1945.

3. Habeeb, A.F.S.A., in "Immunochemistry of Proteins" (Atassi, M.S., ed.), Vol. 3, 223-299, Plenum Press, New York, 1977.

4. Anderer, F.A., Biochim. Biophys. Acta 71, 1246-1248 (1963).

5. Atassi, M.Z., Molec. and Cell. Biochem. 32, 21-43 (1980).

6. Edman, P. und Henschen, A., in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Bd. 8, Protein Sequence Determination, S. 232, Springer, Berlin, 1975.

6a. Sanger, F. und Coulson, A., J. Mol. Biol. 94, 441-448 (1975).

7. Nigg, E.A., Sefton, B.M., Hunter, T., Walter, G. und Singer, S.J., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 4025-4029 (1982).

8. Mariottini, P. et al., Cell 32, 1269-1277 (1983).

9. Law, L.W., Rogers, M.J. und Apella, E., Adv. Canc. Res. 32, 201-237 (1980).

10. Moller, G., Immun. Rev. 62, 1-216 (1982).

11. Papkoff, J., Verna, I.M. und Hunter, T., Cell 29, 417-426 (1982).

12. Anderer, F.A. und Schlumberger, H.D., Biochim. Biophys. Acta 97, 503-509 (1965).

13. Anderer, F.A. und Schlumberger, H.D., Biochim. Biophys. Acta 115, 222-224 (1966).

14. Lerner, R.A., Spektrum d. Wiss. 4, 78 (1983).
15. Sela, M., Biopolymers 22, 415-424 (1983).
16. Arnon, R., Behring Inst. Mitt. 69, 19-29 (1981).
17. Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Green, N. und Lerner, R.A., Ann. Rev. Microbiol. 5, 425-440 (1983).
18. Langbeheim, H., Arnon, R. und Sela, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4636-4640.
19. Sela, M. und Mozes, E., Springer Sem. Immunopath. 2, 119-132 (1979).
20. Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. und Lerner, R.A., Nature 298, 30-33 (1982).
21. Pfaff, E., Mussgay, M., Böhm, H.O., Schultz, G.E. und Schaller, H., EMBO-Journal, 1, 869-874 (1982).
22. Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. und Lerner, R.A., Cell 28, 477-487 (1982).
23. Jackson, D.C., Murray, J.M., White, D.O., Fagan, C.N. und Tregar, G.W., Virology 120, 273-276 (1982).
24. Müller, G.M., Shapira, M. und Arnon, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 569-573 (1982).
25. Prince, A.M., Ikram, H. und Hopp, T.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 579-582 (1982).
26. Hopp, T.P., Molec. Immunol. 18, 869-872 (1981).
27. Lerner, R.A., Green, N., Alexander, H., Liu, F.T., Sutcliffe, J.G. und Shinnick, T.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3403-3407 (1981).
28. Dreesman, G.R., et al., Nature 295, 158-160 (1982).
29. Neurath, A.R., Kent, S.B.H. und Strick, N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, im Druck.
30. Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Arnon, R. und Sela, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5042-5046 (1982).
31. Lederer, E., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1317-1325 (1974).

32. Merser, C., Sinay, P. und Adam, A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 1316-1322 (1975).
33. Freund, J., Ann. Rev. Microbiol. 1, 291-308 (1947).
34. Leach, S.J., Biopolymers, Vol. 22, 425-440 (1983).
35. Atassi, M.Z., Molec. and Cell. Biochem. 32, 21-43 (1980).
36. Atassi, M.Z., Immunochemistry 12, 423-428 (1975).
37. Atassi, M.Z., Immunochem. Proteins 1, 1-161 (1977), Plenum Press, New York.
38. Arnon, R., Maron, E., Sela, M. und Anfinsen, C.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1450-1455 (1971).
39. Arnon, R. und Sela, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 163-170 (1969).
40. Teicher, E., Maron, E. und Arnon, R., Immunochem. 10, 265-271 (1973).
41. Wiley, D.C., Wilson, I.A. und Skehel, J.J., Nature 289, 366-373 (1981).
42. Wilson, I.A., Skehel, J.J. und Wiley, D.C., Nature 289, 366-373 (1981).
43. Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S. und Shinnick, T.M., Cell 28, 477-487 (1982).
44. Crumpton, M.I. und Small, P.A., J. Mol. Biol. 26, 143-146 (1967).
45. Crumpton, M.J., in "The Antigens", (Sela, M., ed.), Vol. 2, 1-78, Acad. Press, New York (1974).
46. Katz, D.H., Adv. Immunol. 29, 137-207 (1980).
47. Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M., Green, N. und Lerner, R.A., Science 219, 660-666 (1982).
48. Kauzmann, W., Adv. Prot. Chem. 14, 1-63 (1959).
49. Walter, G., Scheidtmann, K.H., Carbone, A., Laudano, A.P. und Doolittle, R.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5197-5200 (1980).
50. Rose, G.D. und Roy, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4643-4647 (1980).
51. Hopp, T.P. und Woods, K.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828 (1981).

52. Levitt, M., J. Mol. Biol. 104, 59-107 (1976).
53. Hopp, T.P. und Woods, K.R., Molec. Immunol. 20, 483-489 (1983).
54. Kyte, J. und Doolittle, R.F., J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982).
55. Chou, P.Y. und Fasman, G.D., J. Mol. Biol. 74, 263-281 (1973).
56. Chou, P.Y. und Fasman, G.D., Adv. Enzymol., 47, 251-276 (1978).
57. Zimmermann, S.S. und Scheraga, H.A., Biopolymers 16, 811-843 (1977).
58. Pittsyn, O.B. und Finkelstein, A.V., Biopolymers 22, 15-25 (1983).
59. Schiffer, M. und Edmundson, A.B., Biophys. J. 7, 121-135 (1967).
60. Barley, P.M., Progress in Molecul. Biology 27, S. 3 (Butler, J.A.V., Noble, D., eds.) Pergamon Press, Oxford.
61. Oekonomopulos, R., Dissertation, Universität Tübingen (1978).
62. Smith, J.A. und Pease, L.G., CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 315-399 (1980).
63. Walter, G. und Doolittle, R.F., in Genetic Engineering (Setlow, I.K., Hollaender, A., eds.), Plenum Press, New York (1983).
64. Bolton, A.E. und Hunter, W.M., Biochem. J. 133, 529-538 (1973).
65. Rudinger, J. und Ruegg, U., Bicchem. J. 133, 538-539 (1973).
66. Methods of Hormone Radicimmunoassay (Jaffe, B.M. und Behrman, H.R., eds.) Academic Press, New York (1978).
67. Peters, K. und Richards, F.M., Ann. Rev. Biochem., 46, 523-551 (1977).
68. Chemical Modifications of Proteins, selected methods and analytical Procedures, (Glazer, A.N., Delange, R.J. und Sigman, D.S., eds.) North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1975).

69. Haber, H., Page, L.B. und Jacoby, G.A., Biochemistry 4, 693-698 (1965).
70. Hoare, D.G. und Koshland, D.E., J. Biol. Chem. 242, 2447-2453 (1967).
71. Amino-acids, Peptides, Proteins, Vol. 14, Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, 1983.
72. Carlsson, J., Drevin, H. und Axen, R., Biochem. J. 173, 723-733 (1978).
73. Kitagawa, T. und Aikawa, T., J. Biochem. (Tokyo) 79, 233-239 (1976).
74. Moroder, L., et al., Biopolymers 22, 481-486 (1983).
75. Weltman, J.K., Johnson, S.A., Langeuin, J. und Riester, E.F., Biotechniques 1, 148-152 (1983).
76. Chong, P.C.S. und Hodges, R.S., J. Biol. Chem. 256, 5064 (1981).
77. Guillemin, R., Ling, N. und Vargo, T., Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 361-366 (1977).
78. Auger, G., et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 331-335 (1982).
79. Jung, G. und Brückner, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 291-304 (1981).
80. Wang, S.S., J. Am. Chem. Soc. 95, 1328-1333 (1973).
81. Peters, T., in "The Plasma Proteins", Putnam, 2nd Ed. Vol. 1, Acad. Press, New York (1975).
82. Gros, L., Ringsdorf, H. und Slupp, H., Angew. Chem. 93, 311-332 (1981).
83. Sela, M. und Fuchs, S., in "Handbook of exptl. Immunology"(Weir, D.M. ed.) Blackwell (1978).
84. Rüde, E., Angew. Chem. 82, 202-216 (1970).
85. Chedid, L., Audibert, F., Lefrancier, P., Choay, J. und Lederer, E., Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2472 (1976).
86. Voller, A., Bartleff, A. und Bidwell, D.A., J. Clin. Path. 31, 507-520 (1978).
87. Schnurs, A.H.W.M. und Van Weeman, B.K., Clin. Chem. Acta 81, 1-40 (1977).

88. Strecker, H., Hachmann, H. und Seidel, L., Chemiker Zeitg. 103, 53-68 (1979).
89. Belanger, L., Sylvestre, L. und Dufour, D., Clin. Chim. Acta 48, 15-18 (1973).
90. Wood, H.C., in "MILES-Product Profile" (1982).
91. Beards, G.M. und Bryden, A.S., J. Clin. Path. 34, 1388-1391 (1981).
92. Tabin, H., Staehlin, T. und Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979).
93. Aaalberse, R.C., Clin. Chim. Acta 48, 109 (1973).
94. Brusman, H.P., Anal. Biochem. 44, 606 (1971).
95. Whitehead, T.P., Kricka, L.F., Carter, T.J.N. und Thorpe, G.H.G., Clin. Chem. 25, 1531-1546 (1979).
96. Thore, A., Ann. Clin. Biochem. 16, 359-365 (1979).
97. Dietzgen, R.G., Sander, E., Christner, J. und Jung, G., Eur. J. Biochem. (1984), im Druck.
98. Lane, D. und Doprowski, H., Nature 296, 200-202 (1982).
99. Crawford, L., et al., J. Virol. 42, 612-620 (1982).
100. Dilworth, S.M. und Griffin, B.E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1059-1063 (1982).
101. Walter, G., Hutchinson, M.A., Hunter, T. und Eckart, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 4025-4029 (1982).
102. Merrifield, R.B., Pure & Appl. Chem. 50, 643-653 (1978).
103. The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology (Gross, E. und Meienhofer, J. eds.), Vol. 2, Part A, Academic Press (1980).
104. Arshady, R., Atherton, E., Clive, D.L.J. und Sheppard, R.C., J. Chem. Soc. Perkin 1, 529 (1981).
105. Atherton, E., Logan, C.J. und Sheppard, R.C., J. Chem. Soc. Perkin 1, 538 (1981).

106. Bayer, E., Hemmasi, B., Albert, K., Rapp, W. und Dengler, M., in "Peptides: Structure and Function", Proc. 8th Amer. Peptide Symp., S. 87, Tucson 1983 (Hruby, V.R. und Rich, D.H., eds., Pierce Chem. Comp.).

107. Sheppard, R.C. und Williams, B.J., J. Chem. Soc. Chem. Comm. 587 (1982).

108. Stüber, W., Dissertation, Universität Tübingen (1983).

109. Tjoeng, F.S., Staines, W. und Hodges, R.S., J. Org. Chem. 43, 4190 (1978).

110. Tjoeng, F.S. und Heavner, G.A., J. Org. Chem. 48, 355-359 (1983).

111. Carpino, L.A. und Han, G.Y., J. Am. Chem. Soc. 92, 5748 (1970).

112. Carpino, L.A. und Han, G.Y., J. Org. Chem. 37, 3404 (1972).

113. Atherton, E., et al., J. Chem. Soc. Chem. Comm. 537 (1978).

114. Atherton, E., Bury, C., Sheppard, R.C. und Williams, B.J., Tetr. Lett. 3041 (1979).

115. Carpino, L.A., J. Org. Chem. 45, 4250 (1980).

116. Meienhofer, J., Waki, M., Heimer, E.P., Lambros, T.J., Makofske, R.C. und Chang, C.D., Int. J. Pept. Prot. Res. 13, 35 (1979).

117. Meienhofer, J. und Chang, C.D., Int. J. Pept. Prot. Res. 11, 246 (1978).

118. Lu, G., Mojsov, S., Tam, J.P. und Merrifield, R.B., J. Org. Chem. 46, 3433 (1981).

119. Atherton, E., Woolby, V. und Sheppard, R.C., J. Chem. Soc. Comm., 970 (1980).

120. Brown, E., Williams, B.J. und Sheppard, R.C., J. Chem. Soc. Comm. 1093 (1980).

121. Atherton, E., Hübscher, W., Sheppard, R.C. und Woolby, V., Z. Physiol. Chem. 362, 833 (1981).
122. Sandberg, B.E.B. Lee, C.M., Hanley, M.R. und Iwerson, L.I., Eur. J. Biochem. 114, 329 (1981).
123. Sigler, G.F., Fuller, W.D., Chaturvedi, N.C., Goodman, M. und Verlander, M., Biopolymers 22, 2157-2162 (1983).
124. Martinez, J., Talle, J.C. und Bodanszky, M., J. Org. Chem. 44, 3596 (1979).
125. Bodanszky, M., Deshmane, S.S. und Martinez, J., J. Org. Chem. 44, 1622 (1979).
126. Milstein, C., Spektrum d. Wiss. 12, 97-108 (1980).
127. O'Carra, P., Barry, S. und Griffin, T., Biochem. Soc. Trans. 1, 289-290 (1973).
128. Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963).
129. Chang, C.D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhofer, J., Lundell, E.O. und Haug, J.D., Int. J. Pept. Prot. Res. 15, 59-66 (1980).
130. Wünsch, E. (Hrsg.) in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Bd. 15/1 und 15/2, Thieme, Stuttgart 1973.
131. Hubbuch, A., Kontakte 3, 14-35 (1979).
132. Moroder, L., et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 697-716 (1981).
133. König, W. und Geiger, R., Ber. 103, 788 (1970).
134. Wiesmüller, K.H., Bessler, W. und Jung G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 593-606 (1983).
135. Wünsch, E., Moroder, L., et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 143-152 (1981).

136. Anderer, F.A. und Stroebel, G., Eur. J. Immunol. 2, 274-277 (1972).
137. Hilfenhans, J., Chem. i.u. Zeit 15, 71-77 (1981).
138. Pestka, S., Scient. Am. 8, 29-35 (1983).
139. Goeddel, D.V. et al., Nature 295, 503-508 (1982).
140. Gray, R.W. und Goeddel, D.V., Nature 298, 859-863 (1982).
141. Gallati, H., J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 907-914 (1982).
142. Jung, G. und Brückner, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 275-289 (1981).
143. Shinizu, F., Ohmoto, Y. und Imagawa, K., Biochem. Biophys. Res. Comm. 103, 1145-1156 (1981).
144. Arnheiter, H., Ohno, M., Smith, M. und Gutte, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2539-2543 (1983).
145. Magnusson, C.M., Masson, P.L. und Collet-Casart, D., Europ. Patent Nr. 0051985 (1982).
146. Delaage, M.A., et al., Mol. Immunol. 18, 439-446 (1981).
147. Wünsch, E. und Wendelberger, G., Ber. 100, 820 (1967).
148. Wünsch, E. und Wendelberger, G., Ber. 100, 160 (1967).
148a. Bodanszky, M. und Martinez, J., Synthesis 333 (1981) und dort zitierte Literatur.
149. Gish, D.T., Katsoyannis, P.D., Hess, G.P. und Stedman, R.J., J. Am. Chem. Soc. 87, 5954 (1965).
149a. Ressler, C. und Ratzkin, H., J. Org. Chem. 26, 3356 (1961).
150. Battersby, A.R. und Robinson, J.C., J. Chem. Soc. Comm. 259 (1955).
151. Wünsch, E. und Drees, F., Ber. 99, 110 (1966).
152a. Voelter, W., Jung, G., Breitmaier, E. und Bayer, E., Z. Naturforsch. 26b, 213-222 (1971).
152b. Wüthrich, K., NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, North Holland, Amsterdam 1976.
153. Röllgen, F.W., Nachr. Chem. Tech. Lab. 31, 174-177 (1983).

154. Barber, M., et al., Biomed. Mass. Spectrom. 9, 265 (1982).
155. Dell, A. und Morris, H.R., Biochem. Biophys. Res. Comm. 106, 1456 (1982).
156. Morris, H.R., Int. J. Mass. Spectrom. Ion Phys. 45, 331 (1982).
157. Sieber, P., et al., Helv. Chim. Acta 53, 2135 (1970).
158. Ondotti, M.A. und Bodanszky, M., J. Am. Chem. Soc. 90, 4711-4716 (1968).
159. Roitt, I., Essential Immunology, Blackwell, Scientific Publications, Oxford, London 1980.
160. Belanger, L., Sylvestre, C. und Dufour, D., Clin. Chim. Acta 48, 15 (1973).
161. Hell, H. van., Bosch, A.M.G. und Brands, J.A.M., Z. Anal. Chem. 279, 143 (1976).
162. van Regenmortel, M.H.V., Altschuh, D. und Briand, J.-P., in "Protein Conformation as an Immunological Signal"(Celada, F., Schumaker, V.N. und Sercerz, E.E., eds.), 181-190, Plenum Publishing Corporation, New York 1983.
163. Anderer, F.A. und Strobel, G., Eur. J. Immunol. 2, 274-277 (1977).
164. Dietzgen, R.G. und Sander, E., Arch. Virol. 74, 197-204 (1982).
165. Wünsch, E., Drees, F. und Jentsch, J., Chem. Ber. 98, 803 (1965).
166. Stason, W.B., Vallotton, M. und Haber, E., Biochem. Biophys. Acta 133, 582-584 (1967).
167. Michelin, L., Mammi, S. und Peggion, E., Biopolymers, Vol. 22, 2325-2329 (1983).
168. Saito, H. und Smith, I.C.P., Arch. Biochem. Biophys. 158, 154-163 (1973).
169. Hanssum, H. und Rüterjans, H., Biopolymers 19, 1571-1585 (1980).

170. Boesterling, B. und Engel, J., Biophys. Chem. 9, 201-209 (1979).

171. Klasen, E.A., Rigutti, A., Bos, A. und Bernini, L.F., J. Immunol. Meth. 59, 281-287 (1983).

172. Dietzgen, R.G., Dissertation, Universität Tübingen (1983).

173. Dietzgen, R.G. und Sander, E. in "Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research (Stern, N., ed.), Rowman and Allanheld, New Jersey 1983.

174. Milton, R.C de L., Milton, S.C.F., Van Wechmar, M.B. und Van Regenmortel, M.H.V., Molec. Immunol. 17, 1205-1212 (1980).

175. Wittmann-Liebold, B. und Wittmann, H.G. (1967), Molec. Genetics 100, 358-363 (1967).

176. Werner, S., in 'Biological Chemistry of Organelle Formation"(Bücher, T., Sehald, W. und Weiss, H., eds.) 31. Kolloq. der Ges. f. Biol. Chem. (1980), Springer Berlin 1980.

177. Werner, S. und Sebald, W., in "Methods of Biochem. Analysis" (Glick, D., ed.) 27, 109-170, Wiley Inc. 1981.

178. Werner, S., Eur. J. Biochem. 79, 103-110 (1977).

179. Burger, G. und Werner, S., in "Mitochondria" (Schweyen, R.J., Wolf, K. und Kaudewitz, F., eds.), De Gruyter, Berlin, New York (1983).

179a. Sebald, W., Werner, S. und Weiss, H., in "Methods in enzymology" (Fleischer, S. und Packer, L., eds.) 56, 50-58, Academic Press London, New York (1979)

180. Christner, J., Jung, G., Bozler, G. und Tanswell, P., "Dicarbonsäurehydrazidderivate, ihre Herstellung und Verwendung als Kupplungskomponenten, zum Patent angemeldet, 1984.

181. Sondheimer, E. und Holley, R.W., J. Am. Chem. Soc. 76, 2467 (1954).

182. Wünsch, E. und Drees, F., Chem. Ber. 99, 110 (1966). Bernhard, S.A., et al., J. Am. Chem. Soc. 84, 2421 (1962).
183. Ogura, H., Kobayashi, T., Shimuza, K., Kawabe, K. und Takeda, K., Tetr. Letters 49, 4745-4746 (1979).
184. Gross, S.J., US Patent 3.975.342, (1976).
185. Wisser, H., Hermann, R. und Knoll, E., Clin. Chim. Acta 86, 179-185 (1978).
186. Morel, A.M. und Delaage, M.A., unveröffentlichte Ergebnisse.
187. Van Arx, E., Faupel, M. und Brugger, M., J. Chromatogr. 120, 224-228 (1976).
188. Pataki, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, De Gruyter & Co., Berlin (1966).
189. Matsubara, H. und Sasaki, R.M., Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, No. 2 (1969).
190. Frank, H., Woiwode, W., Nicholson, G. und Bayer, E., Liebigs Ann. Chem. 345-365 (1981).
191. Kaiser, E., Cohscott, R.C., Bossinger, C.D. und Cook, P.J., Anal. Biochem. 34, 595 (1970).
192. Frankel-Conrat, H., Harris, J.I. und Levy, A.L., Methods of biochemical analysis, Vol. 2, S. 359, New York, Interscience, 1955.
193. Ambler, R.P., Methods in enzymology, Vol. XI, S. 155-436, New York, Acad. Press, 1967.
194. Atherton, E., Sheppard, R.C. und Wade, J.D., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1060 (1983).
195. Zahn, H. und Schnabel, E., Liebigs Ann. Chem., 605, 212 (1957).
196. Moroder, L., Hallett, A., Wünsch, E., Keller, O. und Wersin, G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651-1653 (1976).
197. Anderson, G.W., Zimmermann, J.E. und Callahan, F.M., J. Am. Chem. Soc. 89, 5012 (1967).

198. Sheehan, J.C. und Hlavka, J.J., J. Org. Chem. 21, 439 (1956).
199. Goodfriend, T.L., Levine, L. und Fasman, G.D., Science Vol. 144, 1344 (1964).
200. Haber, E., Page, L.B. und Jacoby, G.A., Biochemistry 4, 693 (1965).
201. Wilson, B. und Nakane, R.K. in "Immunofluorescence and Related Staining Techniques", eds. Knapp, W.,
202. Holubar, K. und Wick, G., Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978.
203. Werner, W., Rey, H.G. und Wielinger, H., Z. Analyt. Chem. 252, 224-228 (1970).
204. Gallati, H., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 17, 1-7 (1979).
205. Sarin, V., Kent, S.B.H., Tam, J.P. und Merrifield, R.B., Anal. Biochem. 117, 147-157 (1981).

Danksagung

Neben den bereits im Text erwähnten Personen möchte ich allen Kollegen im Labor und Institut für die stets bereitwillig gewährte Unterstützung danken, insbesondere Herrn K.P. Voges für die zahlreichen NMR-Messungen und Herrn H. Allmendinger für die gaschromatographische Enantiomerenbestimmung.

Lebenslauf

Jürgen Christner

1.1.1955	geboren in Bad Urach als Sohn des Oberingenieurs Walter Christner und seiner Frau Eleonore, geb. Holder
1962-1966	Grund- und Hauptschule in Hülben bei Bad Urach
1966-1974	Schüler am Graf-Eberhard-Gymnasium in Bad Urach
1974-1975	Wehrdienst in Weingarten bei Ravensburg
1975-1980	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 1980	mündl. Hauptdiplomprüfung
1980/1981	Anfertigung der Diplomarbeit: "Darstellung 9(10)-substituierter Octadecansäurederivate von Antibiotika, mit C_4-Spacer und Cyanurchlorid als reaktive Gruppe" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung
1982-1984	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit: "Synthese von Peptiden zur immunologischen Bestimmung von Proteinen" unter Leitung von Prof. Dr. G. Jung, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
Seit WS 83/84	Assistent im Chemiepraktikum für Biologen (Diplom)

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353